

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program
Lékařská biologie**

**Studium nových prognostických faktorů u pacientů
s chronickou lymfocytární leukémií**

**Study of new prognostic markers in patients with chronic
lymphocytic leukemia**

Mgr. Filip Vrbacký

Školitel: prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Obhajoba dne:

(doplň studijní odd.)

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Práce byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové a vznikala s podporou grantu IGA NT 13412-4/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky, projektu koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky a programu PRVOUK P37 Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 1. 4. 2016

Poděkování:

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. RNDr. Miroslavu Červinkovi, CSc. a školiteli konzultantovi doc. MUDr. Pavlu Žákovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při tvorbě této práce. Rád bych též poděkoval doc. MUDr. Lukáši Smolejovi, Ph.D. za spolupráci při získávání klinických vzorků a dat a za cenné rady, které mi v průběhu studia poskytl. Děkuji i všem kolegyním a kolegům ze IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové a Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, kteří mě v průběhu studia podporovali.

V neposlední řadě děkuji i své manželce a dětem za trpělivost po celý čas, kdy tato práce vznikala a městu Polná za poskytnutí zázemí pro její sepsání.

Obsah

1. POUŽITÉ ZKRATKY.....	5
2. CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE.....	9
2.1. Úvod.....	9
2.2. Epidemiologie a etiologie onemocnění.....	9
2.2.1. Původ buněk CLL	10
2.3. Laboratorní diagnostika	11
2.3.1. Krevní obraz a diferenciální počet leukocytů	12
2.3.2. Imunofenotypizace	13
2.3.3. Vyšetření kostní dřeně.....	14
2.4. Klinický průběh.....	14
2.5. Komplikace při onemocnění.....	14
2.6. Léčba	15
2.6.1. Alkylační látky	15
2.6.2. Purinová analoga	16
2.6.3. Kombinovaná chemoterapie.....	16
2.6.4. Monoklonální protilátky - imunoterapie	16
2.6.5. Kombinace chemoterapie a imunoterapie	17
2.6.6. Inhibitory buněčné signalizace	19
2.6.7. Imunomodulační léčba	20
2.6.8. Transplantace krvetvorných buněk	20
2.6.9. Použití lymfocytů s chimerickým antigenním receptorem.....	21
2.7. Stanovení prognózy a biologie CLL	22
2.7.1. Pohlaví.....	24
2.7.2. Klinické stážovací systémy	24
2.7.3. Zdvojovací čas lymfocytů	25
2.7.4. Sérové ukazatele.....	25
2.7.5. Chromozomální aberace.....	26
2.7.6. Mutační stav IGHV	29
2.7.7. Exprese CD38	30
2.7.8. ZAP-70	32
2.7.9. CLLU1	33

2.7.10.	NOTCH1	33
2.7.11.	Sestříhový faktor 3b, podjednotka 1	34
2.7.12.	BIRC3.....	35
2.7.13.	Mutace TP53	35
2.7.14.	Role mikroRNA	36
2.7.15.	Epigenetické změny u CLL.....	37
2.7.16.	Role mikroprostředí.....	39
2.7.17.	Angiogeneze.....	44
3.	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	52
4.	SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODIKY	53
4.1.	Soubor nemocných	53
4.2.	Příprava kalibračních standardů pro PCR	55
4.2.1.	Amplifikace standardu	55
4.2.2.	Extrakce DNA z agarózového gelu.....	56
4.2.3.	Klonování standardu	57
4.2.4.	Izolace plazmidů	60
4.3.	Separace mononukleárních buněk	61
4.3.1.	Použité přístroje.....	61
4.3.2.	Použitý materiál.....	61
4.3.3.	Popis metody	61
4.4.	Izolace RNA pomocí silikátových kolon.....	63
4.4.1.	Použité přístroje.....	63
4.4.2.	Použitý materiál.....	63
4.4.3.	Popis metody	63
4.5.	Reverzní transkripce celkové RNA pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit.....	65
4.5.1.	Použité přístroje.....	65
4.5.2.	Použitý materiál.....	65
4.5.3.	Popis metody	65
4.6.	Kvantifikační PCR pomocí univerzální knihovny sond	67
4.6.1.	Použité přístroje.....	67
4.6.2.	Použitý materiál.....	67
4.6.3.	Popis metody	67

4.7. Separace CD19⁺ buněk z plné krve a příprava buněčných lyzátů.....	69
4.7.1. Použité přístroje.....	69
4.7.2. Použitý materiál.....	69
4.7.3. Popis metody	69
4.8. Izolace celkové RNA.....	71
4.8.1. Použité přístroje.....	71
4.8.2. Použitý materiál.....	71
4.8.3. Popis metody	71
4.9. Reverzní transkripce celkové RNA pomocí SuperScript III First-Strand Synthesis System	73
4.9.1. Použité přístroje.....	73
4.9.2. Použitý materiál.....	73
4.9.3. Popis metody	73
4.10. Kvantitativní PCR v termocykleru RotorGene 6000.....	75
4.10.1. Použité přístroje.....	75
4.10.2. Použitý materiál.....	75
4.10.3. Popis metody	75
4.11. Stanovení exprese molekuly CD38.....	77
4.11.1. Použité přístroje.....	77
4.11.2. Použitý materiál.....	77
4.11.3. Popis metody	77
4.12. Stanovení exprese molekuly ZAP-70	78
4.12.1. Použité přístroje.....	78
4.12.2. Použitý materiál.....	78
4.12.3. Popis metody	78
4.13. Vyšetření mutačního stavu IGHV	80
4.14. Statistické vyhodnocení.....	81
5. VÝSLEDKY.....	82
5.1. Výběr vhodných kandidátních genů.....	82
5.2. Pilotní studie	83
5.2.1. Příprava cDNA	83
5.2.2. Příprava kvantifikačních reakcí.....	83
5.2.3. Příprava standardů pro pilotní studii	84

5.2.4.	Kvantifikace transkripce pomocí PCR v reálném čase	85
5.2.5.	Analýza výsledků pilotní studie	88
5.2.6.	Závěry pilotní studie.....	92
5.3.	Hlavní studie	93
5.3.1.	Příprava cDNA	93
5.3.2.	Příprava kvantifikačních reakcí.....	93
5.3.3.	Kvantifikace pomocí PCR v reálném čase	94
5.3.4.	Analýza výsledků hlavní studie.....	94
6.	DISKUZE	104
7.	ZÁVĚRY	108
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY (ABECEDNĚ).....	109

1. Použité zkratky

Abl1	Tyrozínová kináza (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1)
ADAM	Rodina metaloproteináz (a desintegrin and metaloproteinase)
ADP	Adenosindifosfát (adenosine diphosphate)
ALK	Rodina proteinových kináz (Anaplastic lymphoma kinase)
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
Ang-2	Angiopoetin-2
APRIL	Ligand tumor nekrotizujícího faktoru (a proliferation-inducing ligand)
ATM	Serin/threoninová kináza (ataxia telangiectasia mutated)
B2M	β 2-mikroglobulin
BAFF	Člen rodiny cytokinů TNF (B-cell activating factor)
BAX	Pozitivní regulátor apoptózy (člen rodiny Bcl-2)
BCA-1	Chemokin kódovaný genem CXCL13 (B-cell-attracting chemokine 1)
Bcl-2	Rodina proteinů regulujících apoptózu (B-cell lymphoma 2)
BCR	receptor B-lymfocytů (B-cell receptor)
bFGF	Bazický fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)
BCL3	Transkripční koaktivátor (B-cell lymphoma 3-encoded protein)
BIRC3	Inhibitor apoptózy (Baculoviral IAP Repeat Containing 3)
BMSC	Stromální buňky kostní dřeně (Bone Marrow Stromal Cells)
BR	Bendamustine v kombinaci s rituximabem
BTk	Brutonova tyrozínová kináza
CAR	Chimerický antigenní receptor
CBF1	Faktor vázající DNA (C-repeat-binding factor)
CCL	Ligand receptorů CCR
CCR	Rodina chemokinových receptorů (CC chemokine receptor)
CD	Diferenční skupina (Cluster of Differentiation)
CD105	Endoglin
CDR3	Oblast určující komplementaritu 3 (complementarity determining region 3)
CGH	Komparativní genomová hybridizace (comparative genome hybridization)
CLL	Chronická lymfocytární leukémie
CLLU1	Gen se zvýšenou expresí u CLL 1 (CLL upregulated gene 1)
CRY1	Gen kódující protein účastnící se regulace cirkadiálních cyklů (cryptochrome circadian clock 1)

CXCL	Chemokin, ligand receptorů CXCR
CXCR	Receptor ligandů rodiny CXC
DAP10	Povrchový adaptorový protein (DNAX-activation protein)
DAPK1	Serin/threoninová kináza (death-associated protein kinase 1)
DEPC	Diethylpyrokarbonát (diethylpyrocarbonate)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
FA	Kombinace fludarabinu s alemtuzumabem
FBS	Fetální bovinní sérum
FC	Kombinace fludarabinu s cyklofosfamidem
FCA	Kombinace fludarabinu s cyklofosfamidem a alemtuzumabem
FCR	Kombinace fludarabinu s cyklofosfamidem a rituximabem
FGF-2	Fibroblastový růstový faktor 2 (fibroblast growth factor 2)
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FMC7	Antigen exprimovaný na povrchu B-lymfocytů
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
G-CSF	Faktor stimulující růst kolonií granulocytů (granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	Faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GvL	Štěp proti leukémii (graft-versus-leukemia)
Hb	Hemoglobin
HOXA	Skupina homeotických genů A (homeobox A cluster)
HPRT1	Enzym účastnící se syntézy purinových nukleotidů (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)
Hsp90	Molekulární chaperon (heat shock protein 90)
ICOS	Indukovatelný kostimulátor T-lymfocytů (inducible T-cell costimulator)
IgA	Imunoglobulin izotypu A
IgD	Imunoglobulin izotypu D
IgG	Imunoglobulin izotypu G
IgM	Imunoglobulin izotypu M
ID-1	Inhibitor vazby DNA 1 (Inhibitor of DNA binding 1)
IGHV	Variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu (immunoglobulin heavy chain variable region)

IL	Interleukin
IWCLL	Mezinárodní workshop pro chronickou lymfocytární leukémii (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia)
LAT	Adaptorový protein (Linker for activation of T-cells)
Lck,	Proteinová kináza specifická pro lymfocyty (lymphocyte-specific protein kinase)
LDH	Laktát dehydrogenáza
LDT	Zdvojovací čas lymfocytů (lymphocyte doubling time)
LPL	Lipoproteinová lipáza
MAP kináza	Mitogenem aktivovaná proteinová kináza (mitogen-activated protein kinase)
MBL	Monoklonální B-lymfocytóza
Mcl-1	Antiapoptotický protein, člen rodiny Bcl-2 (myeloid cell leukemia 1)
MDM2	Ubiquitin ligáza (Mouse double minute 2 homolog)
MDR	Mnohočetná léková rezistence (multidrug resistance)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
miRNA	MikroRNA
MMP-9	Matrix-metaloproteináza 9
mTOR	Serin/threoninová kináza - savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin)
MYC	Proto-onkogen
MYCN	Proto-onkogen (též známý jako N-MYC)
NCI-WG	Mezinárodní skupina pro CLL sponzorovaná Národním centrem pro výzkum rakoviny v USA (National Cancer Institute sponsored Working Group on Chronic Lymphocytic Leukemia)
NF-κB	Nukleární faktor kappa B
NUDT6	Gen na vlákně komplementárním s genem pro FGF-2 (nudix-type motif 6)
NGS	Sekvenování nové generace (next generation sequencing)
NK	Přirozený zabíječ (natural killer)
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate-buffered saline)
PDGF	Růstový faktor derivovaný z destiček (platelet derived growth factor)
PECAM-1	Adhezivní molekula destiček a endotelií 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1)
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza (phosphoinositide 3-kinase)

PIGF	Gen kódující protein účastnící se syntézy glykosylfosfatidylové kotvy (phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F)
PKC	Proteinkináza C
PLT	Krevní destičky (platelets)
pre-miRNA	Prekurzorová mikroRNA
pri-miRNA	Primární mikroRNA
Rb	Tumor supresorový gen
RISC	Komplex tlumící translaci prostřednictvím komplementární RNA (RNA-induced silencing complex)
RNA	Ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
sCD105	Solubilní endoglin
sCD23	Solubilní CD23
SCF	Faktor kmenových buněk (stem cell factor)
SDF-1	Faktor 1 odvozený od stromálních buněk (stromal cell-derived factor-1)
SF3B1	Sestříhový faktor 3b, podjednotka 1 (splicing factor 3b, subunit 1)
sIg	Povrchový imunoglobulin (surface immunoglobulin)
SLIT2	Gen kódující protein účastnící se buněčné migrace
SLL	Lymfom z malých lymfocytů (small lymphocytic lymphoma)
Smad	Rodina proteinů účastnících se intracelulární signalizace
SYK	Tyrosinová kináza (spleen tyrosine kinase)
STAT	Přenašeč signálu a aktivátor transkripce (signal transducer and activator of transcription)
TCL1	Leukémie/lymfom z T-lymfocytů 1 (T-cell leukemia/lymphoma 1).
TCR	Receptor T-lymfocytů (T-cell receptor)
TGFβ	Transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
TK	Thymidinkináza
TNF	Faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
TP53	Tumorový protein 53 – gen kódující protein p53
UPL	Univerzální knihovna sond (universal probe library)
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VLA-4	Velmi pozdní antigen 4 (very late antigen-4), α4β1 integrin
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
Wnt	Rodina signálních glykoproteinů (Wingless/Int1)
ZAP-70	70kDa ζ-asociovaný protein (70kDa zeta-chain associated protein)

2. Chronická lymfocytární leukémie

2.1. Úvod

Onemocnění, které je v dnešní době nazýváno leukémií, bylo jako samostatná choroba popsáno v literatuře poprvé v roce 1845 nezávisle na sobě dvěma lékaři, Johnem Bennettem a Rudolfem Virchowem. Samotný název leukémie byl však použit druhým jmenovaným až v roce 1847. Chronická lymfocytární leukémie (CLL), její průběh a klinické projevy byly poprvé podrobně zmíněny v roce 1924 Georgem Minotem a Raphaelem Isaacsem (Minot and Isaacs 1924). V roce 1966 pak byly popsány dva typy tohoto onemocnění s rozdílným dopadem na prognózu nemocných – pomalu a rychle progredující varianty (Galton 1966). O rok později bylo publikováno, že buňky CLL jsou zralé, funkčně nekompetentní lymfocyty (Dameshek 1967). Že se jedná o B-lymfocyty, bylo prokázáno s objevem povrchových imunoglobulinů až v roce 1972 (Aisenberg and Bloch 1972).

V dnešní době je CLL považována za indolentní lymfoproliferativní onemocnění, pro které je charakteristická akumulace klonálních B-lymfocytů s typickým imunofenotypem v periferní krvi, kostní dřeni a lymfatických orgánech. Zatímco morfologicky je toto onemocnění poměrně homogenní, prognóza a vývoj jednotlivých případů se může výrazně lišit a zatím co část pacientů přežívá desítky let a jejich přežití se neliší od zdravé populace, část nemocných umírá na CLL již v průběhu několika let. Z tohoto důvodu je velmi důležité nalézt vhodné prognostické ukazatele, které umožní stanovit prognózu každého nemocného co nejdříve po určení diagnózy, aby bylo možné zvolit adekvátní individuální přístup a bylo možné zahájit léčbu u nemocných s nepříznivou prognózou co nejdříve.

2.2. Epidemiologie a etiologie onemocnění

CLL postihuje především starší populaci a je nejčastěji se vyskytujícím typem leukémie dospělých v euroamerické populaci, neboť tvoří 25 – 30 % všech leukémií v Evropě a Spojených státech amerických (Siegel et al. 2014). Průměrný věk stanovení diagnózy se pohybuje kolem 70 let, jen vzácně se objevují pacienti mladší 40 let. Incidence nemoci je přibližně 5 nových případů na 100 000 obyvatel za rok a výrazně stoupá s věkem (Sant et al. 2010). Postihuje častěji muže než ženy a to v poměru 1,8:1 (Hernandez et al. 1995).

Příčina onemocnění je dodnes neznámá. CLL však vykazuje ze všech leukémií nejvyšší familiární výskyt a riziko vzniku onemocnění u příbuzných 1. stupně je 7x vyšší než v běžné populaci. V této souvislosti se též podařilo objevit i několik genetických a epigenetických změn v rodinách se zvýšeným výskytem CLL, jako jsou zárodečné mutace v genu pro mikroRNA miR-16-1 (Calin et al. 2005) či zárodečné změny v blízkosti genu DAPK1 (Death-associated protein kinase 1), jehož zvýšená metylace vede k narušení regulace apoptózy a k rozvoji leukémie (Raval et al. 2007).

V posledních letech bylo nalezeno několik polymorfizmů, které zvyšují riziko familiárního výskytu CLL a mohou tak přispět k dědičnosti CLL (Crowther-Swanepoel et al. 2010; Slager et al. 2010). Přestože je jejich relativní riziko velmi nízké (1,2 – 1,6) a vyskytují se pouze v malém počtu případů CLL, ukazují, že stejně jako u řady jiných onemocnění, je dědičnost CLL způsobena kombinací většího množství méně významných změn. Použitá metoda genomových asociačních studií však umožňuje detekci pouze alel s výskytem vyšším než 5%. S nástupem moderních citlivějších technologií (jako je sekvenování nové generace) je velmi pravděpodobné, že se podaří objevit další, méně četné varianty, které přispívají k rozvoji tohoto onemocnění.

Incidence CLL se nezvyšuje vlivem alkylačních látek či působením magnetického pole. Nebyla jednoznačně prokázána ani souvislost s virovými infekcemi. Výjimkou je vyšší výskyt u pracovníků v zemědělství či gumárenském průmyslu a u lidí, kteří přicházejí do styku s azbestem a organickými rozpouštědly. Statisticky významně vyšší výskyt CLL byl prokázán i u lidí vystavených ionizujícímu záření (Zablotska et al. 2013). Vzhledem k významné roli antigenů pro vznik CLL se předpokládá, že maligní transformace je spojená s opakovanými antigenními stimuly a následnou replikací DNA a klonální expanzí, což může vést k výše zmiňovanému hromadění genových mutací a chromozomálních aberací. Zda se jedná o setkání s náhodným antigenem či jde o úzký okruh antigenů, není dosud zcela objasněno. Vzhledem k omezenému repertoáru genových segmentů, které se při VDJ přestavbě uplatňují (např. VH 1-69, VH 3-07, VH 4-34), lze však usuzovat, že se nejedná o aktivaci náhodnou a relevantní antigeny jsou poměrně specifické (Kienle et al. 2006).

2.2.1. Původ buněk CLL

Původ buněk CLL také není dosud zcela objasněn. Leukemické lymfocyty mají zvýšenou expresi aktivačních znaků CD23, CD25, CD69 a zároveň sníženou expresi znaků CD22, CD79b a IgD. Typickým znakem pro buňky CLL je pozitivní exprese znaku CD5,

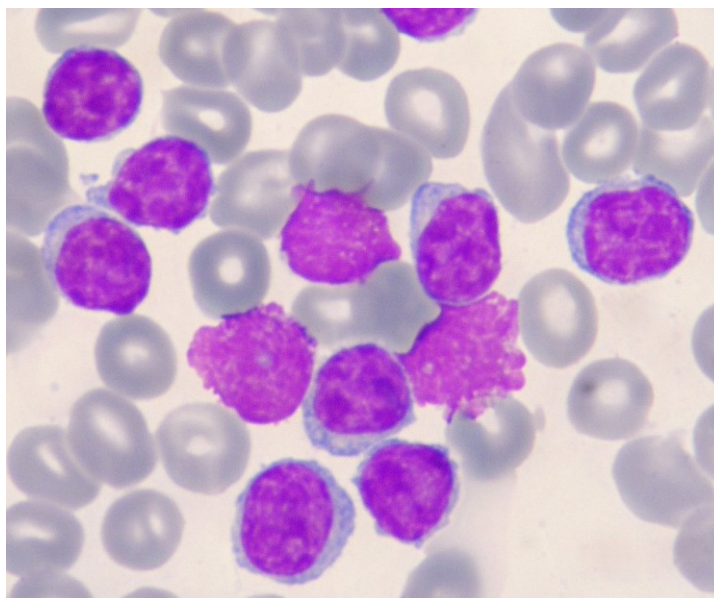
což podporuje teorii, že se jedná o B-lymfocyty, které prošly aktivací (Bertilaccio et al. 2010), neboť tato molekula je u zdravých lymfocytů exprimována pouze na buňkách v periferních lymfatických orgánech a tuto expresi lze navodit aktivací prostřednictvím stimulace protilátkami proti IgM (Wortis et al. 1995). Rozdílná míra somatických hypermutací těžkých řetězců imunoglobulinových genů (IGHV) u různých případů CLL ukazuje, že tato choroba může pocházet z různě vyzrálých B-lymfocytů (Chiorazzi and Ferrarini 2011). Velmi podobné expresní profily maligních lymfocytů s mutovaným i nemutovaným IGHV v některých studiích však naopak naznačují, že oba typy pocházejí z jednoho buněčného typu (Klein et al. 2001). Z novějších epigenetických studií ovšem vyplývá, že metylace DNA v maligních buňkách s nemutovaným IGHV připomíná spíše naivní B-lymfocyty s fenotypem IgD⁺, CD27⁻ či zralé pregerminální B-lymfocyty (CD5⁺, IgD⁺, CD27⁻). B-lymfocyty s mutovaným IGHV jsou podobné spíše paměťovým buňkám (IgM/D⁺, IgA/G⁺, CD27⁺). Při těchto experimentech byl navíc objeven třetí typ lymfocytů, jejichž metylace DNA odpovídá částečně oběma výše zmiňovaným skupinám. Tyto buňky mají sice většinou mutovaný IGHV, míra hypermutace je však spíše nízká (Kulis et al. 2012). Následná analýza transkripčních profilů buněk CLL potvrdila, že buňky s nemutovaným IGHV pocházejí nejspíše z pregerminálních zralých B-lymfocytů. Původcem buněk s mutovaným IGHV jsou patrně postgerminální buňky (CD5⁺, CD27⁺) (Seifert et al. 2012). Velmi zajímavé jsou i výsledky experimentů s xenogenní transplantací hematopoetických kmenových buněk. Po transplantaci došlo opět k rozvoji fenotypu CLL byť s jiným typem VDJ přestavby, než byla u původního klonu, takže tyto buňky již patrně nesou základní epigenetické změny vedoucí k transformaci maligních lymfocytů (Kikushige et al. 2011).

2.3. Laboratorní diagnostika

Diagnostická kritéria pro CLL vycházejí z doporučení National Cancer Institute Sponsored Working Group on Chronic Lymphocytic leukemia (NCI-WG) (Cheson et al. 1996) a novějších International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) publikovaných v roce 2008 (Hallek et al. 2008). Základními laboratorními vyšetřeními pro určení diagnózy CLL jsou krevní obraz, diferenciální počet leukocytů, jejich morfologie a imunofenotypizace.

2.3.1. Krevní obraz a diferenciální počet leukocytů

Pro stanovení diagnózy CLL je nezbytné prokázat přítomnost alespoň 5×10^9 B-lymfocytů/l v periferní krvi nemocného s prokázanou klonalitou těchto lymfocytů pomocí průtokové cytometrie. Leukemické buňky nalezené v nátěru periferní krve jsou většinou malé zralé lymfocyty s úzkým lemem cytoplazmy kolem denzního jádra s agregovaným chromatinem bez patrných jadérek (Obr. 1). Vyskytovat se však mohou i větší, atypické, buňky, buňky se zářezy v jádře či prolymfocyty, které však nesmějí tvořit více než 55 % veškerých lymfocytů, neboť by tak onemocnění splnilo základní diagnostické kritérium prolymfocytární leukémie (Melo et al. 1986). V nátěrech periferní krve nemocných s CLL se také často vyskytují tzv. Gumprechtovy stíny, což jsou zbytky jader z buněk prasklých při přípravě nátěru (viz Obr. 1).



Obr. 1: Panopticky obarvený nátěr periferní krve nemocného s CLL. Zvětšení: 1000x.

Foto: autor

Diagnóze CLL je velmi blízký lymfom z malých lymfocytů (SLL - Small Lymphocytic Lymphoma), jehož buňky mají shodný imunofenotyp, ale nesplňují kritérium lymfocytózy při přítomnosti lymfadenopatie či organomegalie. SLL a CLL jsou však v podstatě totožná onemocnění s jinou tkáňovou lokalizací, takže aktuální klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2008 řadí obě nemoci do společné jednotky CLL/SLL (Hallek, et al. 2008). V případě absence lymfadenopatie či organomegalie se onemocnění popisuje jako tzv. monoklonální B-lymfocytóza (MBL), která byla nalezena u přibližně 3,5 % zdravých lidí (Rawstron et al. 2002). U přibližně 1 – 2 % z nich dochází ročně k progresi do CLL a MBL

je proto považována za prekancerózu k CLL a CLL pravděpodobně vždy předchází (Landgren et al. 2009).

2.3.2. Imunofenotypizace

Typické maligní lymfocyty CLL splňují imunofenotyp CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD23⁺ se slabou expresí povrchového imunoglobulinu (sIg). Molekula CD20 (stejně jako molekula CD79b) je však exprimována výrazně méně, než na povrchu zdravých B-lymfocytů či B-lymfocytů ostatních lymfoproliferativních onemocnění. Lymfocyty CLL na svém povrchu typicky neexprimují molekulu FMC7. Na základě těchto poznatků lze pro diagnostiku CLL použít skórovací systém dle Royal Marsden (viz Tab. 1) (Moreau et al. 1997).

Znak CD5, jehož přítomnost je pro CLL charakteristická, se fyziologicky nachází pouze na povrchu T-lymfocytů. Kromě CLL je však tento znak přítomný i na povrchu buněk lymfomu z pláštěvé zóny. Tyto buňky však na svém povrchu většinou nenesou znak CD23. Maligní klon exprimuje výhradně jeden typ lehkých řetězců, tzn. pouze lehké řetězce kappa nebo pouze lambda (Hallek, et al. 2008).

Tab. 1: Skórovací systém pro stanovení diagnózy dle Royal Marsden. Většina případů CLL má skóre 4-5, ostatní lymfoproliferace naopak 0-2 (Moreau, et al. 1997).

Znak	1 bod	0 bodů
CD5	Pozitivní	Negativní
CD23	Pozitivní	Negativní
sIg	Slabě pozitivní	Silně pozitivní
CD79b	Slabě pozitivní	Silně pozitivní
FMC7	Negativní	Pozitivní

2.3.3. Vyšetření kostní dřeně

Cytologické a histologické vyšetření kostní dřeně není nezbytné pro stanovení diagnózy CLL a od jejich používání se tedy opouští. Toto vyšetření může být doporučeno pouze ve vybraných případech, jako je např. rozlišení původu přetrvávající cytopenie po léčbě způsobené terapií od cytopenie způsobené přetrvávajícím onemocněním (Hallek, et al. 2008).

2.4. Klinický průběh

Klinický průběh onemocnění je u pacientů s CLL, jak již bylo zmíněno, velmi různorodý. Zatímco malá část nemocných vyžaduje zahájení léčby krátce po stanovení diagnózy (nebo dokonce již v době jejího stanovení), jiní s indolentní variantou nevyžadují léčbu po řadu let. Mezi klinické projevy CLL patří zvětšení mízních uzlin a splenomegalie. V pozdějších stádiích onemocnění dochází k postižení krvetvorby infiltrací kostní dřeně maligními lymfocyty a může tak dojít ke vzniku anémie či trombocytopenie. Zpravidla při větší nádorové masě se mohou objevit i systémové příznaky, jako např. noční pocení, horečky, opakující se infekce či úbytek hmotnosti.

2.5. Komplikace při onemocnění

Nejčastější komplikací provázející CLL jsou infekce. Jedná se o infekce jak bakteriálního, virového, tak mykotického charakteru a jsou způsobené převážně poruchou imunity vedoucí k hypogamaglobulinémii. Postižení imunitního systému u nemocných s CLL je komplexní a netýká se pouze B-lymfocytů. Maligní lymfocyty prostřednictvím přímého kontaktu i působením různých cytokinů, jako je např. Il-6, Il-10 či TGF- β , negativně ovlivňují funkci CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocytů (Gorgun et al. 2005). Poškozená je i funkce NK buněk, u kterých je možné pozorovat snížené množství azurofilních granulí v cytoplazmě (Kay and Zarling 1984).

S vyšší incidencí se u pacientů s CLL objevují autoimunitní onemocnění, jako např. autoimunitní hemolytická anémie či autoimunitní trombocytopenie. Díky snížené funkci imunitního systému jsou ale nemocní s CLL ohroženi i dalšími sekundárními malignitami. U 5-10 % nemocných navíc dochází k transformaci CLL do agresivnějšího lymfoproliferativního onemocnění (tzv. Richterova syndromu), jako je např. difúzní velkobuněčný lymfom (Jain and O'Brien 2012).

2.6. Léčba

Ačkoli léčba CLL zaznamenala v posledních desetiletích velký pokrok, je nejvhodnějším přístupem k nemocným v časných či intermediárních stádiích (Binet A/B a Rai 0-II) bez příznaků stále pečlivé sledování při pravidelných lékařských kontrolách, neboť se nepodařilo prokázat pozitivní dopad časného zahájení léčby těchto nemocných. Léčba je zahajována pouze v případě průkazu aktivity onemocnění splněním alespoň jednoho z následujících kritérií (Hallek, et al. 2008):

- 1) Rozvoj nebo zhoršení anémie a/nebo trombocytopenie z důvodu selhávání kostní dřeně.
- 2) Masivní, progredující nebo symptomatická splenomegalie.
- 3) Masivní, progredující nebo symptomatická lymfadenopatie.
- 4) Rozvíjející se lymfocytóza se vzestupem o více než 50 % do 2 měsíců nebo zdvojení počtu lymfocytů do 6 měsíců při vyloučení jiných vlivů, jako je např. infekce.
- 5) Autoimunitní anémie a/nebo trombocytopenie špatně odpovídající na kortikosteroidy či jinou standardní léčbu.
- 6) Symptomy spojené s onemocněním, mezi které patří nechtěný úbytek hmotnosti větší než 10 % za 6 měsíců, výrazná únava, horečka vyšší než 38 °C po dobu alespoň 2 týdnů bez průkazu infekce a noční pocení po dobu alespoň 1 měsíce bez průkazu infekce.

Samotná leukocytóza není indikací k zahájení léčby, neboť případy leukostázy jsou u pacientů s CLL velmi vzácné. Vysoké riziko (Binet C, Rai III – IV) s anémií či trombocytémií se obecně považuje za indikaci k zahájení léčby.

2.6.1. Alkylační látky

Jedním z nejstarších léků používaných na léčbu CLL je alkylační cytostatikum **chlorambucil**. Pro svou nízkou toxicitu a cenu je ve vybraných případech (např. u nemocných s významnými přidruženými chorobami) stále používán. Jeho účinnost je však velmi nízká - kompletních remisí dosahuje jen velmi zřídka (< 5 %) (Rai et al. 2000). Při dlouhodobém užívání tohoto léku byly prokázány vedlejší účinky, jako jsou např. cytopenie, myelodysplázie či akutní leukémie (Dighiero et al. 1998). Statisticky významně lepší léčebný efekt byl prokázán u novějšího alkylačního cytostatika, **bendamustinu**. Ve srovnávací studii dosáhlo celkové odpovědi při monoterapii bendamustinu 59 % nemocných oproti 30 % u chlorambucilu a delší byl i medián přežití do progresu (22 oproti 8 měsícům) (Knauf et al. 2009). V současné době je bendamustin

registrován pro léčbu nemocných, kterým nemůže být podána léčba fludarabinem (Knauf, et al. 2009).

2.6.2. Purinová analoga

Nejrozšířenějším a nejlépe prostudovaným purinovým analogem, které se používá pro léčbu CLL, je **fludarabin**. Při srovnání účinku monoterapie fludarabinem s alkylačními látkami a kortikosteroidy bylo prokázáno, že došlo ke zvýšení počtu celkových odpovědí na léčbu (Anaissie et al. 1998; Plunkett et al. 1993; Rai, et al. 2000). Ve srovnání s dalšími konvenčními chemoterapiemi dosahuje tento typ léčby vyššího počtu kompletních remisí. Prodloužení celkového přežití však při léčbě samotným fludarabinem prokázáno nebylo (Rai, et al. 2000; Steurer et al. 2006).

2.6.3. Kombinovaná chemoterapie

Alkylační látky a purinová analoga působí prostřednictvím odlišných cytotoxických účinků a současné podávání obou typů látek vede ke zvýšenému efektu na maligní lymfocyty (Bellosillo et al. 1999). Přidání chlorambucilu k fludarabinu vedlo u pacientů s CLL ke zvýšení hematologické toxicity a celkové odpovědi terapie (Rai, et al. 2000). V současné době nejrozšířenější kombinací je však kombinace fludarabinu s alkylačním cytostatikem cyklofosfamidem (FC), která ve srovnání s monoterapií fludarabinem dosáhla vyššího počtu celkových odpovědí, kompletních remisí i doby do progresu (Catovsky et al. 2007; Eichhorst et al. 2006).

2.6.4. Monoklonální protilátky - imunoterapie

Nástup biologické léčby pomocí monoklonálních protilátek znamenal významnou změnu v léčebném přístupu nejen k CLL, ale i dalším nízcí i vysoce maligním lymfoproliferativním onemocněním. První molekulou schválenou pro léčbu CLL byla chimérická myší/lidská protilátka proti povrchovému znaku CD20 **rituximab**. Ačkoli je pro buňky CLL typický snížený výskyt CD20 na povrchu, přítomné množství stačí k tomu, aby navázaná protilátka aktivovala komplement a efektorové buňky imunitního systému. To vede ke zničení maligních lymfocytů. Samostatně tato protilátka není příliš účinná. Vyššího účinku lze dosáhnout pouze zvýšením dávky či častějším podáváním, což je finančně

velmi náročné. Rituximab však potencuje účinnost cytostatické léčby a je proto používán v kombinaci s již dříve používaným režimem fludarabinu s cyklofosfamidem (viz dále).

Další protilátkou, která je používána v léčbě CLL je humanizovaná potkaní protilátka anti-CD52 **alemtuzumab**. Povrchový znak CD52 se vyskytuje pouze na zralých lymfocytech, monocytech a makrofázích, takže alemtuzumab nepoškozuje krvetvorné kmenové buňky. Vzhledem k deplecím zdravých B- i T-lymfocytů však vede k častým oportunním, zejména mykotickým, infekcím a je tudíž nutné jej podávat v kombinaci s profylaktickou léčbou. Častou komplikací je i reaktivace cytomegalovirové infekce, doporučuje se proto provádět pravidelný monitoring na její přítomnost. V současné době je schválen pro použití i v první linii léčby CLL, jeho hlavní využití je však u relabujících nemocných, případů CLL refrakterních na fludarabinové režimy (např. nemocných s delecí 17p) či těch, kde fludarabin být použit nemůže (Mauro et al. 2012).

Spektrum protilátek, které lze využít při léčbě CLL, se v posledních letech rozrůstá. Mezi nová léčiva patří např. **ofatumumab**, což je plně lidská anti-CD20 protilátka, která rozpoznává odlišný epitop než rituximab a při stejné toxicitě více aktivuje komplement (Teeling et al. 2006). Použití ofatumumabu již bylo schváleno regulačními úřady v Evropě i Spojených státech při léčbě CLL refrakterní na fludarabin a alemtuzumab a nově též v kombinaci s chlorambucilem či bendamustinem v první linii léčby u nemocných nevhodných na fludarabinový režim.

Další protilátkou proti CD20 je **obinutuzumab**. U této protilátky II. typu byla ve srovnání s rituximabem *in vitro* prokázána vyšší cytotoxicita zprostředkovaná protilátkami, vyšší míra buněčné smrti zprostředkovaná mechanismy nezávislými na apoptóze i apoptózy (Patz et al. 2011). V klinických studiích 1. fáze obinutuzumab prokázal účinek u nemocných s CLL i u nemocných s CLL s dalšími komorbiditami (Goede et al. 2013). V kombinaci s chlorambucilem zvýšil významně léčebné výsledky u starších/komorbidních nemocných v 1. linii ve smyslu zvýšení počtu kompletních remisí, prodloužení období bez progresu i celkového přežití vůči monoterapii chlorambucilem či kombinaci chlorambucil + rituximab (Goede et al. 2014; Goede et al. 2015).

2.6.5. Kombinace chemoterapie a imunoterapie

Výsledky preklinických a následných klinických studií testujících přidání monoklonální protilátky rituximab ke klasické chemoterapii ukázaly, že synergistické působení těchto léčiv vede ke zlepšení odpovědi, prodlouženému přežití bez progresu a prodloužení celkového

přežití (Tam et al. 2008). Tyto výsledky byly následně potvrzeny v rozsáhlé prospektivní mezinárodní multicentrické randomizované studii fáze III CLL8 (817 pacientů), která porovnávala do té používanou léčbu fludarabinem a cyklofosfamidem (FC) s fludarabinem, cyklofosfamidem a rituximabem (FCR). Studie prokázala, že pacienti s FCR mají celkově vyšší počet odpovědí, mají více kompletních remisí, delší dobu přežití do progrese i celkové přežití (Hallek et al. 2010). Analýza cytogenetických prognostických znaků navíc ukázala, že FCR je účinnější napříč všemi skupinami s výjimkou del(17p). Podobné výsledky byly posléze prokázány při porovnání těchto dvou léčebných protokolů u již předlčených pacientů s CLL (Robak et al. 2010). Na základě výsledků této studie je režim FCR v současné době považován za standard léčby nemocných s CLL, kteří jsou v dobrém stavu a nemají závažná přidružená onemocnění. U starších či komorbidních nemocných s CLL, pro které je režim FCR příliš toxický, je možné použít redukováný režim nízkodávkovaný FCR (Smolej 2012).

U nemocných s CLL byla zkoušena i léčba kombinací rituximabu s bendamustinem (BR). Při použití v léčbě první linie u fit nemocných v rámci randomizované studie CLL10 byl režim BR významně méně účinný ve smyslu nižšího počtu kompletních remisí i období do progrese vůči protokolu FCR, zároveň však byl režim BR výrazně méně toxický (závažné neutropenie, závažné infekce). Režim BR lze považovat za alternativu k FCR u starších fit nemocných s vysokým rizikem infekce (Eichhorst et al. 2014). Na základě předběžných výsledků randomizované studie MABLE, ve které kombinace BR dosáhla významně vyššího počtu kompletních remisí i prodloužení přežití vůči kombinaci rituximab + chlorambucil u nemocných nevhodných pro kombinovaný fludarabinový režim, je BR v současné době používán i u starších / komorbidních nemocných v rámci léčby 1. linie. Je možné jej také použít u nemocných s relapsem/refrakterní CLL (Fischer et al. 2012).

Studie porovnávající účinnost kombinace FC s jinou protilátkou, alemtuzumabem, (FCA) ve srovnání s FCR musela být předčasně ukončena pro vysokou toxicitu a mortalitu spojenou s léčbou FCA (Lepretre et al. 2012). V jiné studii zabývající se možností využít alemtuzumab při terapii CLL byla porovnávána kombinace fludarabinu s alemtuzumabem (FA) a fludarabin v monoterapii u relabujících pacientů s refrakterní CLL. V této studii byl prokázán přínos přidání alemtuzumabu, neboť nemocní léčení FA dosahovali delší doby do progrese a celkového přežití při vyšší toxicitě FA, ale podobné četnosti úmrtí způsobeného léčbou (Elter et al. 2011).

Kombinace vysokodávkovaných kortikoidů a monoklonálních protilátek je užitečnou možností léčby relabujících/refrakterní CLL, zejména u starších nemocných či při výskytu

závažných cytopenií v důsledku předchozí cytostatické léčby. Nejpoužívanějším režimem v rámci České republiky je kombinace rituximabu a dexametazonu (Smolej et al. 2012), obdobné výsledky byly dosaženy při použití kombinace ofatumumab + dexametazon (Doubek et al. 2015).

2.6.6. Inhibitory buněčné signalizace

Objev zásadní role mikroprostředí a buněčné signalizace v rozvoji CLL vedl k zaměření pozornosti vývoje nových léčiv proti CLL na oblast inhibitorů signálních drah důležitých pro rozvoj onemocnění. Jednou z nejlépe prozkoumaných drah je signalizace pomocí B-buněčného receptoru (BCR), které se podrobněji věnuje kapitola 2.7.1.2. *B-buněčný receptor (BCR)*. Signalizace BCR je zprostředkována pomocí kináz asociovaných s tímto receptorem, mezi které patří i kináza Syk, jejíž aktivace spouští další buněčné děje vedoucí k proliferaci buněk a jejich rezistenci na signály spouštějící apoptózu. **Fostamatinib**, inhibitor kinázy Syk, skutečně navozuje u maligních lymfocytů apoptózu prostřednictvím inhibice signalizace BCR. Klinická studie 2. fáze prokázala u nemocných s CLL slibný počet celkových odpovědí (Friedberg et al. 2010).

Ibrutinib je orálně podávaný ireverzibilní inhibitor Brutonovy kinázy, další významné molekuly přenášející signál od BCR do nitra buňky. Na rozdíl od klasických protokolů chemo- a chemoimunoterapie je tento lék podáván dlouhodobě až do následné progresse onemocnění nebo nepřijatelné toxicity, kdy je zapotřebí léčbu ukončit. První studie ukázaly, že ibrutinib je velmi dobře snášen a je účinný při terapii nemocných s relabující refrakterní CLL (Byrd et al. 2013). Ibrutinib také prokázal vyšší účinnost ve smyslu celkových odpovědí, přežití bez progresse i celkového přežití nemocných s relabující/refrakterní CLL v porovnání s ofatumumabem (Byrd et al. 2014). V současné době probíhají studie kombinující ibrutinib s rituximabem či chemoimunoterapií. Kromě zvýšení apoptózy maligních lymfocytů však inhibice BTK ovlivňuje i řadu dalších fyziologických procesů, jako je např. funkce krevních destiček či funkce imunitního systému, což může vést k nežádoucím účinkům, jako je krvácení či infekce (Herman et al. 2011).

Idelalisib umožňuje spuštění apoptózy u maligních lymfocytů CLL bez ovlivnění T-lymfocytů a NK buněk prostřednictvím selektivní inhibice fosfatidylinositol-3-kinázy δ (PI3K δ) (Hoellenriegel et al. 2011). V klinické studii 1. fáze, při které byl podáván idelalisib nemocným s refrakterní relabující CLL, byla prokázána aktivita proti maligním lymfocytům při přijatelné toxicitě (Brown et al. 2014). V kombinaci s rituximabem byl idelalisib schválen

pro léčbu relabující/refrakterní CLL, neboť ve dvojité slepé, placebem kontrolované studii fáze III prokázal lepší dosažení léčebné odpovědi a delší období do progresu i celkové přežití v porovnání s kombinací rituximab + placebo (Furman et al. 2014).

Jedním z mechanismů prodlouženého přežití maligních lymfocytů CLL je zvýšená exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 v těchto buňkách. Jako možná účinná terapie se tedy nabízí i inhibice tohoto proteinu. V posledních letech bylo syntetizováno několik molekulárních inhibitorů proteinů rodiny Bcl-2. U nemocných s CLL v současné době probíhají studie zjišťující účinek venetoclaxu (**ABT-199**, **GDC-0199**), což je perorální specifický inhibitor Bcl-2, jehož podávání ve studii 1. fáze vedlo k velmi rychlému poklesu lymfocytů již během 24 hodin (Souers et al. 2013). Výsledky studie fáze I/II jsou také velice povzbudivé (Roberts et al. 2014). V současné době probíhá randomizovaná studie fáze III porovnávající kombinaci venetoclax + rituximab vůči režimu BR (studie MURANO; NCT02005471).

2.6.7. Imunomodulační léčba

Léčebné odpovědi u nemocných s relabující refrakterní CLL bylo dosaženo i pomocí imunomodulační léčby lenalidomidem, derivátem thalidomidu (Ferrajoli et al. 2008), který způsobuje zvýšenou expresi kostimulačních signálů na maligních lymfocytech (např. CD40, CD95), jejichž antigen prezentující funkce je u CLL jinak snížena (Chen et al. 2011). Lenalidomid zároveň působí na T-lymfocyty a prostřednictvím zvýšené exprese CD154 (CD40L) zvyšuje tendenci maligních lymfocytů zahájit procesy vedoucí k apoptóze. Zároveň stimuluje zdravé B-lymfocyty k produkci protilátek (Lapalombella et al. 2010). Lenalidomid také zvyšuje expresi molekuly CD20 na povrchu maligních lymfocytů, čímž zvyšuje jejich citlivost k anti-CD20 protilátkám. Synergické působení lenalidomidu a rituximabu bylo prokázáno *in vitro* (Acebes-Huerta et al. 2014). V současné době se studuje možné využití této kombinace při léčbě nemocných s CLL (James et al. 2014).

2.6.8. Transplantace krvetvorných buněk

Přestože běžné terapeutické přístupy zvyšují počty remisí a délku léčebné odpovědi, je jediným způsobem, jak lze CLL trvale vyléčit, alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk. Nerelapsová mortalita je však u klasických myeloablativních režimů velmi vysoká (dle evropského transplantačního registru až 46 %), a proto se u CLL prakticky nepoužívá. Výrazného poklesu mortality při zachování účinné reakce štěpu proti leukémii

bylo dosaženo snížením radiační zátěže a cytostatik u tzv. nemyeloablativních režimů, které vedou k imunosupresi umožňující přihojení dárcovského štěpu, ale nezničí kompletně krvetvorbu příjemce. Při využití efektu reakce štěpu proti leukémii (GvL) je možné dosáhnout kompletního zničení leukemického klonu při výrazně nižší potransplantační mortalitě, která se pohybuje pouze kolem 26 % a je možné ji provést i u starších nemocných (65 let). Tato metoda je proto v současné době výrazně upřednostňována před klasickým myeloablativním režimem. Problémem zůstává chronická extensivní reakce štěpu proti hostiteli a relapsy po alogenní transplantaci. Autologní transplantace má nízkou potransplantační mortalitu - randomizované studie 3. fáze však neprokázaly příznivý vliv této léčebné modality (Michallet et al. 2011) a u CLL byla proto opuštěna.

2.6.9. Použití lymfocytů s chimerickým antigenním receptorem

Jedním z důležitých kroků při transformaci maligních buněk je aktivace ochranných mechanismů před působením imunitního systému, který by nádorové buňky jinak odstranil. Tyto mechanismy mohou být pasivní (např. ztráta specifických antigenů na povrchu buněk (Vago et al. 2009)) či aktivní (změna mikroprostředí a parakrinního působení prostřednictvím řady mediátorů, jako je např. TGF β (Zou 2005)). Stejně jako v případě reakce štěpu proti leukémii je tak důležité najít způsob, jak tuto obranu maligních lymfocytů obejít. Jednou z metod, jejíž možné využití se v posledních letech významně studuje, je použití T-lymfocytů s chimerickým antigenním receptorem (tzv. CAR lymfocytů).

CAR lymfocyty jsou geneticky modifikované T-lymfocyty samotného pacienta produkující receptory rozpoznávající specifické antigeny na povrchu maligních buněk. V případě CLL tedy B-lymfocytů. Mezi nejčastěji využívané antigeny u CLL patří molekula CD19 (Wang et al. 2007). Využívají se však i antigeny na molekule CD20, lehké řetězce imunoglobulinů či antigen ROR1 (Hudecek et al. 2010). Navázání antigenu na extracelulární část receptoru vede k aktivaci intracelulární části této molekuly a následnému spuštění signálních drah, které stačí pro kompletní aktivaci T-lymfocytu. Vzhledem k vyšší účinnosti byly v případě CLL testovány převážně CAR lymfocyty druhé generace, jejichž intracelulární oblast je odvozena nejčastěji od molekul CD28, CD134, CD137, Lck, ICOS a DAP10 (Sadelain et al. 2009; Wang, et al. 2007; Yvon et al. 2009; Zhao et al. 2009).

Pilotní studie testující CAR molekuly specifické proti molekule CD19 prokázaly, že využití CAR lymfocytů bylo u pacientů účinné a to i v případě pokročilých stádií

chemorefrakterního onemocnění (Brentjens et al. 2010; Kalos et al. 2011). Úspěšné použití CAR lymfocytů bylo prokázáno i v případě použití receptorů proti dalším antigenům na povrchu B-lymfocytů (Till et al. 2012; Vera et al. 2006). Velmi zajímavé je především použití receptoru proti povrchovým molekulám CD23 a ROR1, které se nevyskytují na zdravých B-lymfocytech a léčba je tedy specifická proti maligním buňkám CLL. V malých studiích byl léčebný účinek při použití receptorů proti oběma antigenům prokázán (Giordano Attianese et al. 2011; Hudecek, et al. 2010). V současné době probíhají studie, které mají za cíl stanovit vhodné složení intracelulární oblasti receptoru s optimální skladbou domén aktivujících různé signální dráhy, studuje se možnost prodloužení přežití modifikovaných lymfocytů v krvi pacientů, neboť i ta má vliv na klinický výsledek léčby.

CAR mohou být napadány imunitním systémem příjemce, což je možné částečně vyřešit použitím plně humanizovaných receptorů vnášených pomocí elektroporace, aby se předešlo produkci virových antigenů exprimovaných při použití retrovirových, resp. lentivirových vektorů (Lamers et al. 2011). Vzhledem k problémům spojeným s použitím CAR lymfocytů u jiných onemocnění (Lamers et al. 2006; Morgan et al. 2006; Morgan et al. 2010) jsou velmi podrobně analyzovány nežádoucí účinky spojené s použitím tohoto typu léčby u CLL. Jak již bylo zmíněno dříve, použití receptorů proti antigenu CD19 vedlo k eliminaci zdravých B-lymfocytů a u těchto nemocných je tedy třeba počítat s intravenózním podáváním imunoglobulinů (Kochenderfer et al. 2012; Kochenderfer et al. 2010).

Velká pozornost je věnována i možným problémům spojeným s použitým vektorem a jím způsobenou mutagenezí (Baum et al. 2006; Hacein-Bey-Abina et al. 2008). Komplikované je i zjištění optimálního počtu podaných T-lymfocytů. Na rozdíl od běžného léčiva se totiž mohou v těle nemocného dále množit a to v závislosti na řadě faktorů, jako je např. variabilní koncentrace cytokinů (Restifo et al. 2012) nebo počet maligních lymfocytů (Brentjens et al. 2011). Po analýze výsledků studií zabývajících se těmito problémy by se využití lymfocytů s chimerickým antigenním receptorem mohlo stát dalším léčebným přístupem s kurativním potenciálem a vysokou selekcí proti maligním lymfocytům u nemocných s CLL a to včetně refrakterních a relabujících případů.

2.7. Stanovení prognózy a biologie CLL

Chronická lymfocytární leukémie je indolentní lymfoproliferativní onemocnění, jehož průběh je mimořádně heterogenní. Zatímco řada nemocných vůbec nevyžaduje léčbu

a dožívají se s dobrou kvalitou života stejného věku jako lidé bez této choroby, existuje skupina nemocných, kteří rychle progredují a přes intenzivní léčbu umírají za několik let od stanovení diagnózy. Včasné zahájení vhodné léčby je pro ně tedy velmi důležité. Výzkum CLL v posledních letech je tak ve velké míře zaměřen na hledání tzv. prognostických ukazatelů CLL, které by umožnily co nejdříve identifikovat, zda se jedná o CLL s pomalým průběhem nebo agresivnější, rychle progredující variantu. Stále používané klasické znaky založené na stanovení stádia onemocnění dle Bineta a Raie, zdvojovacím čase lymfocytů či infiltraci kostní dřeně ukazují spíše na aktuální stav onemocnění a nejsou tedy vhodné pro stanovení prognózy v časném stádiu, kdy je v dnešní době většina případů diagnostikována. Díky intenzivnímu výzkumu v posledních letech se podařilo objevit řadu znaků nových. Jejich efekt je však stále intenzivně zkoumán a při léčbě CLL se k nim pro nedostatek důkazů či nízkou míru standardizace nepřihlíží.

Hledání prognostických ukazatelů je velmi úzce spojeno se stále se rozvíjejícím poznáním biologie onemocnění a lze je od sebe jen velmi těžko oddělit. Nové biologické poznatky jsou často hodnoceny z pohledu možného prognostického využití a jejich prognostický účinek nám naopak umožňuje je zasadit do širšího rámce působení samotného onemocnění. To také přispělo k obrovskému rozmachu poznání CLL v posledních desetiletích. Zatímco dříve byla CLL považována za onemocnění pocházející ze zralých, imunologicky nekompetentních lymfocytů, které se kumulují pouze z důvodu poškození signálních drah, které vedou buňku k apoptóze (jako je např. zvýšená exprese antiapoptotického genu Bcl-2), v posledních letech se pohled na toto onemocnění výrazně změnil a na CLL je pohlíženo spíše jako na heterogenní chorobu pocházející z B-lymfocytů, které se mohou lišit stupněm aktivace, zralosti nebo buněčným podtypem. CLL je tak brána spíše jako onemocnění, pro které je typická dynamická rovnováha mezi aktivně se dělícími buňkami v zárodečných centrech lymfatických orgánů a klidovými buňkami, které jsou odolné vůči apoptóze a cirkulují v periferní krvi (Messmer et al. 2005). Aktivní proliferace navíc může vést ke vzniku a hromadění genových mutací a chromozomálních aberací, z nichž některé dále ovlivňují biologii i klinický vývoj CLL. Intenzivní studium biologie CLL s sebou přineslo i řadu dalších poznatků, které již našly či právě nacházejí své uplatnění ve stanovení prognózy či léčbě této nemoci.

2.7.1. Pohlaví

Pohlaví a věk také ovlivňují prognózu pacientů s CLL. Toto onemocnění je nejen častější u mužů než u žen, jak již bylo zmíněno v úvodu, muži mají i horší prognózu (Catovsky et al. 1989). Podstata tohoto rozdílu však není dosud známa. Při rozhodování o zahájení léčby se k pohlaví nepřihlíží.

2.7.2. Klinické stážovací systémy

Již více než třicet let se pro stanovení rizika a zahájení léčby u pacientů s CLL používají klinické stážovací systémy dle Raie a Bineta (viz Tab. 2 a Tab. 3) (Binet et al. 1981; Rai et al. 1975). Oba jsou založeny na stanovení prognózy na základě fyzikálního a laboratorního vyšetření a spíše než budoucí vývoj onemocnění popisují jeho současný stav. Nejsou tudíž schopné rozeznat pacienty, kteří budou brzy rychle progredovat již v časném stádiu choroby. Oba tyto systémy jsou velmi jednoduché a stratifikují nemocné do 3 skupin podle rizika.

Tab. 2: Stážovací systém dle Raie

Stádium (Rai)	Riziko dle modifikovaného stagingu	Klinický nález	Medián přežití (měsíce)*
0	nízké	Lymfocytóza	> 150
I	střední	Lymfocytóza, lymfadenopatie	101
II	střední	Lymfocytóza, splenomegalie a/nebo hepatomegalie	71
III	vysoké	Lymfocytóza, anémie (Hb < 110 g/l)	19
IV	vysoké	Lymfocytóza, trombocytopenie (PLT < 100 × 10 ⁹ /l)	19

PK - periferní krev, KD - kostní dřeň, Hb - hemoglobin, PLT – trombocyty

* V původní publikaci (Rai, et al. 1975).

Tab. 3: Stážovací systém dle Bineta

Stádium (Binet)	Riziko	Klinický nález	Medián přežití (měsíce)*
A	nízké	postižení méně než 3 oblastí	nedosažen
B	střední	postižení 3 a více oblastí	84
C	vysoké	anémie a/nebo trombocytopenie (Hb < 100 g/l, PLT < 100 × 10 ⁹ /l)	24
Postižené oblasti jsou definovány přítomností zvětšených lymfatických uzlin větších než 1 cm v průměru nebo organomegalii			
Oblasti: 1 - hlava a krk včetně Waldeyerova okruhu, 2 - axily, 3 - třísla včetně povrchové femorální oblasti, 4 - hmatná slezina, 5 - hmatná játra (klinicky zvětšená)			

Hb - hemoglobin, PLT – trombocyty

* V původní publikaci (Binet, et al. 1981).

2.7.3. Zdvojovací čas lymfocytů

Zdvojovací čas lymfocytů (LDT - Lymphocyte Doubling Time) je definován jako doba, za kterou se zvýší absolutní počet lymfocytů v periferní krvi na dvojnásobek. Hodnoty kratší než 12 měsíců znamenají i u nemocných s nízkým a středním rizikem dle Raie a nízkým rizikem dle Bineta horší prognózu a kratší dobu přežití při porovnání s pacienty s LDT delším než 12 měsíců. LDT lze brát v úvahu i při posuzování potřeby léčby CLL, neboť při LDT kratším než 6 měsíců by se mělo uvažovat o jejím zahájení. Vždy je však zapotřebí posuzovat toto kritérium opatrně a předem vyloučit možné jiné příčiny, než samotné onemocnění, jako je např. infekce (Hallek, et al. 2008).

2.7.4. Sérové ukazatele

Prognostický vliv u CLL byl prokázán i u řady molekul, které je možné detekovat v séru nemocných. Sérová aktivita **laktát dehydrogenázy** (LDH) je považována za ukazatel buněčného obratu a její zvýšení ukazuje na vyšší aktivitu řady hematologických malignit. U CLL bylo zjištěno, že pacienti se zvýšenou LDH mají horší prognózu, kratší dobu přežití a vyšší riziko transformace do Richterova syndromu (Fasola et al. 1984; Lee et al. 1987).

Navíc bylo prokázáno její spojení i s řadou dalších nepříznivých ukazatelů, jako je např. delece 17p či vysoká exprese CD38 a ZAP-70 (Van Bockstaele et al. 2009).

Thymidinkináza (TK) je enzym, který hraje důležitou roli při syntéze DNA. TK se vyskytuje i v séru a její koncentrace se zvyšuje při pokročilejších stádiích CLL a progresi onemocnění. Vysoká koncentrace TK byla prokázána u nemocných s nemutovaným těžkým řetězcem imunoglobulinu (Magnac et al. 2003). Nízkou koncentrací TK v séru lze použít i jako prediktivní ukazatel, neboť tato skupina nemocných s CLL reaguje dobře na léčbu fludarabinem (Di Raimondo et al. 2001).

Zvýšený sérový **β 2-mikroglobulin** (B2M), který tvoří součást hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I. třídy, ukazuje na pokročilý stav CLL s výraznou lymfadenopatií a pokročilé onemocnění. Nemocní ve stádiu A dle Bineta s vysokou koncentrací B2M mají navíc kratší dobu do progresu, což potvrzuje možnost využití B2M jako jednoho z prognostických ukazatelů (Gentile et al. 2009).

Kratší doba přežití byla prokázána i u nemocných ve stádiu A dle Bineta s vysokou koncentrací **solubilního CD23** (sCD23) v séru (Sarfati et al. 1996).

2.7.5. Chromozomální aberace

U více než 80 % nemocných s CLL je přítomna alespoň jedna či více cytogenetických poruch, které lze detekovat pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) (Stilgenbauer et al. 2000). Na rozdíl od jiných malignit jsou u CLL velmi vzácné vyvážené translokace a mnohem častěji se objevují změny nevyvážené. Mezi nejčastěji se opakující patří delece 13q14, trizomie chromozomu 12, delece 11q22-23 a delece 17p13. Stanovení těchto abnormalit má klinický význam, neboť u řady z nich byl prokázán dopad na projev choroby a celkové přežití nemocných (Dohner et al. 2000). Standardně používaná metoda interfázní FISH, díky které není zapotřebí využívat buňky v metafázi, umožňuje detekci pouze několika vybraných (výše zmíněných) chromozomálních aberací, což značně omezuje pohled na velmi komplexní oblast genomových aberací u CLL. Tento problém může být odstraněn s využitím nových technologií, jako je např. komparativní genomová hybridizace (CGH), která s sebou přinesla objev dalších nevyvážených abnormalit, jako např. trizomie chromozomu 19 zahrnující oblast s geny důležitými pro regulaci buněčného cyklu a regulaci apoptózy (jako jsou např. Cyklin E, BCL3 a BAX) či amplifikace oblasti 2p24, která obsahuje gen pro onkogen MYCN (Schwaenen et al. 2004). Velký přínos přineslo i využití tzv. DNA čipů. Díky jejich využití se podařilo objevit další abnormality a to nejen početní, ale i ztrátu

heterozygoty v určitých oblastech (Pfeifer et al. 2007). DNA čipy navíc umožnily detailnější prozkoumání již známých aberací, což přineslo důkazy o vysoké heterogenitě některých z nich.

2.7.5.1. Delece 13q

Delece 13q14 se vyskytuje u 40 – 60 % případů CLL a většinou se vyskytuje jako samostatná aberace. Nemocní, u kterých se delece 13q objevuje samostatně, mají lepší prognózu než pacienti bez ní či s větším počtem chromozomálních přestaveb. Novější studie ovšem ukazují, že i v této skupině se vyskytují jedinci se špatnou prognózou. Pacienti s více než 80 % buněk s delecí 13q mají kratší celkové přežití i čas do zahájení léčby než pacienti s nižším zastoupením těchto buněk (Van Dyke et al. 2010). Význam hraje i rozsah delece. Délka deletované oblasti je totiž velmi variabilní a dosahuje rozpětí od několika set tisíc párů bází až k desítkám miliónů (Mosca et al. 2010; Ouillet et al. 2008a). V případě kratších variant dochází k delecí či alespoň snížení exprese mikroRNA miR-15a a miR-16-1 (Calin et al. 2002), které ovlivňují růst, regulaci buněčného cyklu i apoptózu prostřednictvím narušení regulace exprese řady genů včetně Bcl-2 (Cimmino et al. 2005). V případě delší delece je však zasažen i gen Rb, čímž dochází ke zvýšení nestability genomu a prognóza těchto nemocných je nepříznivá (Dal Bo et al. 2011; Ouillet et al. 2008b).

2.7.5.2. Trizomie 12

Trizomie 12. chromozómu se vyskytuje v 10 – 20 % případů CLL a je spojována s kratší dobou do progresu. Výsledky analýz z posledních let však ukazují, že tito nemocní mají delší celkové přežití (Hallek, et al. 2010). U nemocných s trizomií 12. chromozómu se často vyskytuje atypická morfologie a imunofenotyp maligních lymfocytů s vyšším zastoupením prolymfocytů a vyšší exprese povrchových imunoglobulinů a FMC7 (Matutes et al. 1996). Jaké geny jsou zodpovědné za tyto projevy je stále předmětem intenzivního zkoumání. Vzhledem k rozsahu aberace je velmi obtížné nalézt relevantní geny. Několik kandidátních genů však již nalezeno bylo. Prvním z nich je gen MDM-2, který leží v oblasti 12q15 a u CLL je zvýšeně exprimován (Merup et al. 1997). Dalším je CLLU1 (12q22), jehož zvýšená exprese byla zjištěna u nemocných s kratším celkovým přežitím (Josefsson et al. 2007). Tato zvýšená exprese se vyskytuje i u nemocných, u kterých nebyla trizomie 12 prokázána a je patrně způsobena jinými mechanismy (Buhl et al. 2006b).

2.7.5.3. Delece 11q

U přibližně 10 % nemocných s CLL lze nalézt delecii části dlouhého raménka 11. chromozómu. Tato přestavba je statisticky významně spojena s výraznou lymfadenopatií, rychlejší progresí a kratším celkovým přežitím (Dohner et al. 1997). Novější práce však ukazují, že průběh onemocnění u těchto nemocných může být poměrně variabilní a liší se podle počtu buněk maligního klonu s touto aberací. Nemocní, kteří mají delecii 11q ve více než 25 % buněk mají kratší dobu do zahájení léčby (Marasca et al. 2013). Na molekulární úrovni bylo prokázáno, že deletovaná oblast obsahuje gen ATM. Produkt tohoto genu je jednou z klíčových molekul v reparačních mechanismech buněk v případě výskytu dvouvláknových zlomů DNA a reguluje případné spuštění apoptotických procesů v buňce, jejíž nukleová kyselina je takto poškozena (Lavin 2008).

2.7.5.4. Delece 17p

U přibližně 5 % neléčených nemocných s CLL byla prokázána delece části krátkého raménka 17. chromozómu. Prognóza u pacientů, u kterých je tato aberace nalezena ve více než 25 % buněk je velmi špatná a průběh onemocnění je většinou agresivní, čas do progresu i celkové přežití jsou zkrácené a onemocnění hůře reaguje na léčbu (Tam et al. 2009). Delece je velmi rozsáhlá a ve většině případů zahrnuje téměř celé krátké raménko. Vždy zahrnuje lokus TP53 kódující protein p53, který je velmi důležitý pro správnou regulaci buněčného cyklu, odpověď buňky na poškození DNA a případné zahájení procesů vedoucích k apoptóze. Pomocí této dráhy působí i řada cytostatických léčiv, jako fludarabin či alkylační látky a právě poškození p53 je patrně důvodem špatné odpovědi těchto nemocných na léčbu (Gonzalez et al. 2011). Samotná delece je navíc velmi často doprovázena mutacemi v této oblasti na druhém chromozómu 17, což vede k poškození obou alel a prohloubení negativního efektu (viz. kap. 2.7.13. *Mutace TP53*) (Dicker et al. 2009; Rossi et al. 2009).

2.7.5.5. Translokace

Translokace jsou u CLL vzácné a mají obecně (obzvláště jsou-li nebalancované) negativní dopad na prognózu onemocnění. Nejčastěji se opakují přestavby zahrnující imunoglobulinové geny, které však tvoří méně než 5 % případů CLL. Mezi nejčastěji nalezené partnery v těchto přestavbách lze nalézt geny BCL2, BCL3, BCL11A a c-MYC. V řadě případů se však nepodařilo partnera nalézt (Cavazzini et al. 2008).

2.7.5.6. Komplexní karyotyp

Prognóza nemocných s komplexním karyotypem (alespoň 3 chromozomální aberace) je velmi nepříznivá se špatnou odpovědí na léčbu a krátkou dobou přežití. Ke kumulaci aberací dochází v průběhu onemocnění a maligní klon tak prochází vývojem, který může vést k evoluci fenotypu buněk (Dewald et al. 2003). Je tedy nezbytné sledovat, jak se onemocnění vyvíjí nejen v době záchytu, ale i před zahájením terapie, neboť některé aberace (např. del(17p)) mohou ovlivnit následující léčbu.

2.7.5.7. Chromotripse

Sekvenování nové generace (NGS – Next Generation Sequencing) objevilo nový druh komplexních změn na úrovni chromozomů, tzv. chromotripsi (Stephens et al. 2011). Při tomto typu poškození DNA dochází zatím neznámým procesem k rozsáhlým katastrofickým přestavbám jediné chromozomální oblasti. U CLL byla popsána u přibližně 2 % případů a je spojována s nemutovaným IGHV, poškozením TP53 a špatnou prognózou (Edelmann et al. 2012).

2.7.6. Mutační stav IGHV

Receptor pro antigen na povrchu B-lymfocytů je zodpovědný za rozpoznávání široké palety antigenů, se kterými se mohou tyto buňky ve své existenci setkat. Tato variabilita, nezbytná pro správnou funkci imunitní odpovědi, je způsobena řadou mechanismů. Geny pro těžké i lehké řetězce receptoru vznikají náhodnou kombinací z širokého repertoáru genových segmentů V, D a J, ze kterých je výsledná molekula složena. Po setkání receptoru s antigenem dojde v buňce navíc k aktivaci mechanismů, které způsobí hromadění mutací ve variabilní (V) oblasti receptorového genu. Tyto mutace (tzv. somatické hypermutace) dále zvyšují variabilitu BCR a kvalitu odpovědi prostřednictvím selekce mutantů, kteří mají vyšší specifitu receptoru vůči antigenu. Celý tento proces probíhá v germinálních centrech lymfatických folikulů pod přímou kontrolou mikroprostředí (Krejsek and Kopecký 2004).

Nemocné s CLL je možné rozdělit na dvě skupiny podle míry somatických hypermutací těžkých řetězců imunoglobulinového genu. U části nemocných vykazuje sekvence těžkého řetězce imunoglobulinu minimálně 98% homologii se zárodečnou DNA (tzv. nemutované IGHV). Tyto buňky patrně pocházejí z naivních B-lymfocytů a prognóza takových nemocných se významně liší od nemocných, kteří mají homologii nižší než 98 % (tzv. mutované IGHV) a jejichž maligní lymfocyty pocházejí patrně z paměťových

B-lymfocytů. (Schroeder and Dighiero 1994) Bylo prokázáno, že lymfocyty s nemutovaným IGHV mají častěji atypickou morfologii, onemocnění má agresivnější průběh a nemocní mají významně kratší dobu přežití ve srovnání s nemocnými s mutovaným IGHV (Damle et al. 1999; Hamblin et al. 1999). U nemocných s nemutovaným IGHV se navíc častěji vyskytují nepříznivé chromozomální aberace, jako je del(17p), del(11q). U nemocných s mutovaným IGHV byl naopak pozorován vyšší výskyt spíše příznivé delece 13q (Oscier et al. 1997).

Rozdělení podle míry mutací v genu pro IGHV má však své výjimky. Např. prognóza pacientů s přestavbou VH3-21 je podobná jako u skupiny s nemutovaným IGHV bez ohledu na míru mutací, takže nemocní s mutovaným IGHV mají špatnou prognózu (Tobin et al. 2002), jak potvrdily i další studie (Bomben et al. 2007; Ghia et al. 2008; Thorselius et al. 2006). Přibližně polovina nemocných s touto přestavbou navíc používala stejnou oblast určující komplementaritu 3 (complementarity determining region 3, CDR3) a stejnou přestavbu lehkého řetězce VL3-21 (Thorselius, et al. 2006; Tobin et al. 2003; Tobin et al. 2004). Tato zjištění vedla k zásadnímu objevu, že velká část nemocných exprimuje pouze omezený repertoár tzv. stereotypů BCR a k rozvoji CLL je patrně důležité setkání pouze s některými antigeny (Chiorazzi et al. 2005; Rosen et al. 2010). V současné době existuje 19 definovaných skupin CLL založených na stereotypii BCR. Přibližně 30 % nemocných s CLL spadá do některé z těchto skupin (Agathangelidis et al. 2012). Členové stejné skupiny mají i podobnou prognózu. Např. členové skupiny 2 (mezi které patří i přestavba VH3-21) mají všichni špatnou prognózu bez ohledu na mutační stav IGHV (Bomben et al. 2009; Ghia, et al. 2008; Ghia et al. 2005; Stamatopoulos et al. 2007; Thorselius, et al. 2006).

Dřívější finanční náročnost a komplikovanost provedení testu však v minulosti vedly řadu pracovišť k hledání dalších znaků, které by mohly být využity ke stanovení prognózy CLL s podobnou účinností při snazším a levnějším provedení. Nejdůležitější z nich jsou popsány dále v textu.

2.7.7. Exprese CD38

CD38 je transmembránový glykoprotein lokalizovaný na cytoplazmatické membráně různých typů buněk, jako jsou např. lymfocyty, myeloidní buňky, NK buňky, ale i krevní destičky, erytrocyty, řada buněk nehematologického původu v mozku, osteoblasty a osteoklasty (Malavasi et al. 2008). CD38 hraje důležitou roli v řadě procesů, jako je sekrece insulinu pankreatickými buňkami (Johnson et al. 2006) nebo resorpce kostí (Sun et al. 2003). Intracelulárně jsou signály z CD38 přenášeny především prostřednictvím intracelulárního

vápníku, jehož uvolnění není spouštěno prostřednictvím klasické dráhy využívající inositol trifosfát, ale ADP-ribózu (Partida-Sanchez et al. 2001; Sano et al. 2001). Správná funkce CD38 je nezbytná v některých imunologických procesech a jeho působení je důležité pro správnou aktivaci T-lymfocytů (Magnone et al. 2012), chemotaxi neutrofilních granulocytů (Partida-Sanchez, et al. 2001) a produkci chemokinů monocytů (Yamamoto et al. 2008). Agonistické působení protilátek proti CD38 na povrchu nezralých prekurzorů B-lymfocytů indukovalo u těchto buněk apoptózu, což vedlo ke snížení tvorby B-lymfocytů (Kumagai et al. 1995). Aktivace na povrchu zralých B-lymfocytů naopak vedla ke zvýšení proliferační aktivity a snížení apoptózy prostřednictvím zvýšené exprese řady molekul včetně Bcl-2 (Funaro et al. 1997; Zupo et al. 1994).

Na povrchu lymfocytů je CD38 organizovaný v signalizačních komplexech označovaných jako lipidové rafty, ve kterých interaguje s TCR na povrchu T-lymfocytů a s komplexem BCR/CD19 v případě B-lymfocytů (Malavasi, et al. 2008). Přítomnost CD38 na povrchu ovlivňuje komunikaci maligních lymfocytů s mikroprostředím, neboť přítomnost CD38 zvyšuje intenzitu signalizace prostřednictvím CXCL12 (Vaisitti et al. 2010). Kromě signalizační funkce se CD38 patrně účastní i zvýšení síly fyzické interakce. Jediným dosud známým ligandem CD38 je molekula CD31 (PECAM-1), která je exprimovaná na povrchu endoteliálních buněk a CD38 tak může působit jako selektin (Deaglio et al. 1998).

Možnost prognostického využití CD38 u nemocných s CLL byla objevena při studiu imunofenotypových rozdílů maligních lymfocytů rozdělených podle v té době již známého mutačního stavu IGHV (Damle, et al. 1999). U nemocných s vysokým počtem CD38 pozitivních maligních lymfocytů byla prokázána kratší doba celkového přežití, pokročilejší stádium onemocnění a snížená odpověď na léčbu (Damle, et al. 1999; Durig et al. 2002). Velmi diskutovanou problematikou týkající se využití CD38 je množství buněk, u kterých musí být exprese této molekuly pozitivní. Řada prací používá 30 % (Damle, et al. 1999; Hamblin et al. 2002), jiné ale zmiňují 20 % (Durig, et al. 2002; Ibrahim et al. 2001), některé dokonce 7 % (Krober et al. 2002; Thornton et al. 2004). Rozpory panují i ohledně stability exprese CD38 v průběhu onemocnění. Některé práce uvádějí, že exprese CD38 se v souvislosti s progresí ani zahájením léčby CLL nemění (Durig, et al. 2002; Thornton, et al. 2004). V jiných se naopak ukázalo, že míra exprese CD38 roste po zahájení terapie (Hamblin, et al. 2002; Ibrahim, et al. 2001). Expresi CD38 mohou navíc měnit i další vlivy, jako jsou další souběžně probíhající onemocnění či postižení imunitního systému. Tyto nejasnosti brání širšímu využití CD38 jako prognostického znaku u nemocných s CLL a jeho rutinní stanovení se tedy nedoporučuje.

2.7.8. ZAP-70

ZAP-70 (ζ -asociovaný protein o molekulové hmotnosti 70 kDa) je nitrobuňčná tyrozinová kináza, která se vyskytuje v T-lymfocytech a NK buňkách (Chan et al. 1992), kde zprostředkovává signalizaci prostřednictvím receptoru T-lymfocytů vedoucí k aktivaci buněk, změně jejich pohyblivosti a buněčné smrti. Po aktivaci TCR ligandem dojde ve spolupráci s kostimulačními signály poskytovanými molekulami CD4 a CD8 prostřednictvím komplexů MHC I. a II. třídy k fosforylaci intracelulárních oblastí CD3. Následná fosforylace ZAP-70 a dalších proteinů, jako je např. adaptorový protein LAT (Linker for activation of T-cells), vede k vytvoření komplikovaných komplexů propagujících signál dál do buňky. Vrozené imunitní defekty spojené s poškozením signalizace prostřednictvím ZAP-70 u T-lymfocytů, resp. NK buněk ukazují, že jeho role v tomto procesu je velmi důležitá (Bene 2006).

Ačkoli se původně předpokládalo, že ZAP-70 je exprimovaný pouze v těchto typech buněk (Chan, et al. 1992), byla jeho exprese následně prokázána jak v maligních buňkách CLL, tak normálních B-lymfocytech (Rosenwald et al. 2001; Scielzo et al. 2006). V B-lymfocytech se ZAP-70 účastní signalizace prostřednictvím BCR podobně jako příbuzná kináza Syk (Chen et al. 2002) a svou přítomností zvyšuje citlivost odpovědi na aktivaci CCR7 a CXCR4 (Calpe et al. 2011; Messmer et al. 2011). Podobně jako v T-lymfocytech hraje ZAP-70 v maligních lymfocytech roli v komunikaci buněk s mikroprostředím a schopnosti migrace lymfocytů do sekundárních lymfatických orgánů (Richardson et al. 2006).

Stejně jako v případě CD38 byla prognostická hodnota variabilní exprese ZAP-70 v maligních lymfocytech CLL objevena při analýze buněk nemocných rozdělených podle rozdílného mutačního stavu IGHV. ZAP-70 z ní vyšel jako jeden z nejlépe odpovídajících genů (Rosenwald, et al. 2001). Výsledky následujícího výzkumu ukázaly, že nemocní s vysokou expresí ZAP-70 mají skutečně agresivnější formu CLL a kratší přežití (Crespo et al. 2003; Chen et al. 2005; Chen, et al. 2002).

V současné době je pro stanovení ZAP-70 používána metoda průtokové cytometrie, která má však několik úskalí zabraňujících jejímu širšímu použití v klinické praxi. Exprese ZAP-70 v maligních buňkách není uniformní (Boelens et al. 2007; Sheridan et al. 2006) a neexistuje standardní metodika zpracování buněk, což je v případě ZAP-70 o to komplikovanější, že se jedná o intracelulární molekulu a výsledek je velmi závislý na způsobu permeabilizace membrán, která je nezbytná pro obarvení vnitřních struktur buňky (Shankey et al. 2006). Různé klony protilátek navíc poskytují různé výsledky, což situaci dále

komplikuje (Shankey, et al. 2006). Nejednotná je i hranice určující pozitivitu. Nejčastěji využívaná je 20 %, která dobře odlišuje pacienty nejen podle mutačního stavu IGHV, ale i času do zahájení léčby (Rassenti et al. 2004). Možným řešením těchto problémů by mohlo být využití stanovení exprese mRNA ZAP-70 pomocí PCR v reálném čase, tato metoda však není běžně využívána. Stanovení exprese ZAP-70 tedy není (stejně jako CD38) doporučováno k rutinnímu vyšetřování.

2.7.9. CLLU1

V roce 2006 byl objeven gen, jehož exprese byla prokázána pouze v buňkách CLL a byl proto nazván CLLU1 (CLL upregulated gene 1) (Buhl, et al. 2006b). Ačkoli se CLLU1 nachází na dlouhém raménku chromozomu 12, míra exprese nebyla závislá na přítomnosti trizomie této oblasti, jak se původně předpokládalo (Buhl, et al. 2006b). Tato původní práce prokázala, že CLLU1 je vysoce exprimován v buňkách nemocných s nemutovaným IGHV, což následně prokázaly práce spojující navíc vysokou expresi CLLU1 s agresivnějším průběhem onemocnění, kratším časem do zahájení léčby, kratším celkovým přežitím, výskytem nepříznivých chromozomálních aberací a vysokou expresí ZAP-70 (Buhl et al. 2006a; Josefsson, et al. 2007; Kaderi et al. 2011). Korelace s nemutovaným IGHV a vysokou expresí ZAP-70 a CD38 byla potvrzena i v nedávné studii hodnotící 515 nemocných s CLL. Tato studie však nepotvrdila rozdíl v délce celkového přežití a odpovědi na léčbu (Gonzalez et al. 2013). Nejslibnější oblastí využití CLLU1 je tak detekce nemocných, kteří budou potřebovat léčbu, ačkoli ostatní prognostické znaky ukazují, že mají dobrou prognózu (Josefsson, et al. 2007) a velmi citlivé sledování minimální zbytkové choroby u nemocných s CLL, které nebude ovlivněno ostatními buňkami, neboť jiné než maligní lymfocyty CLL tento protein neexprimují (Buhl et al. 2011).

2.7.10. NOTCH1

Velký rozmach metod paralelního sekvenování v posledních letech umožnil sekvenaci mnoha genomů maligních lymfocytů a porovnání jejich sekvencí se zárodečným genomem. To vedlo k nálezům řady mutací relevantních z hlediska biologie i prognózy CLL. Jedním z prvních genů, který byl takto objeven, je NOTCH1 (Puente et al. 2011; Rosati et al. 2009; Sportoletti et al. 2010). Signalizace prostřednictvím receptorů Notch probíhá nejčastěji mezi sousedními buňkami a účastní se regulace řady dějů včetně buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. Molekuly této rodiny tvoří heterodimerní receptory. Každá z podjednotek

se skládá z extracelulární domény, která váže ligand, transmembránové domény a intracelulární domény, která je důležitá pro signalizaci. Na rozdíl od jiných receptorů, jejichž signalizace je většinou reverzibilní (např. fosforylace) a využívá dalších molekul pro přenos signálu do cytoplazmy a jádra, je aktivace receptorů z rodiny Notch nevratná a samotný receptor funguje jako transkripční faktor. Po navázání ligandu dojde k proteolytickému odštěpení části receptoru metaloproteázou ADAM, což vytvoří místo štěpené γ -sektretázovým komplexem. Uvolněná intracelulární doména pak putuje do jádra, kde se váže na DNA-vazebné proteiny (např. CBF1) a funguje jako aktivátor transkripce. Kromě této dráhy může intracelulární doména aktivovat i jiné signalizační molekuly, jako je např. protein mTOR.

Již dříve byly mutace NOTCH1 objeveny u více než 50 % nemocných s T-ALL (Weng et al. 2004). U CLL byly nalezeny přibližně v 10 % případů v době diagnózy (Fabbri et al. 2011; Puente, et al. 2011). Většina mutací nalezených v lymfocytech CLL vede k předčasnému ukončení translace proteinu, kterému tak chybí C-koncová doména nezbytná pro inaktivaci signalizace. V buňkách CLL, které normálně konstitutivně produkují NOTCH1 se tak hromadí mutovaná aktivnější forma NOTCH1 (Rosati, et al. 2009). Nález mutací v genu NOTCH1 je prognosticky nepříznivý a je asociovaný s nemutovaným IGHV, výskytem mutací či delecí genu TP53, kratší dobou do progresu i do zahájení léčby a celkového přežití. Tito nemocní mají téměř 6 krát vyšší riziko transformace do Richtova syndromu (Rossi et al. 2012b) a jejich CLL je častěji refrakterní na fludarabin (Fabbri, et al. 2011). Mutace genu NOTCH1 jsou významně asociované s trizomií chromozómu 12, která je sice často brána jako znak středního rizika, ale v kombinaci s mutacemi NOTCH1 má tato skupina nemocných nepříznivou prognózu. Buňky s trizomií chromozómu 12 a mutovaným NOTCH1 mají navíc odlišný expresní profil se zvýšenou expresí genů regulujících buněčný cyklus (Del Giudice et al. 2012).

2.7.11. Sestřihový faktor 3b, podjednotka 1

Další mutace, které hrají roli při rozvoji a progresi CLL byly nalezeny v sestřihovém faktoru SF3B1, který je součástí malého jaderného ribonukleoproteinového komplexu U2, který tvoří součást jádra spliceozómu a účastní se rozpoznání místa větvení při sestřihovém procesu. Zásah do tohoto faktoru nevede k poškození sestřihu, které by postihlo plošně všechny nebo alespoň většinu buněčných proteinů, ale postihuje spíše jejich úzkou skupinu. Ve studiích s inhibitory SF3B1 bylo prokázáno, že se jedná hlavně o proteiny účastnící se

regulace buněčného cyklu, regulace apoptózy a angiogeneze (Wang et al. 2011). Správná funkce spliceozómu není navíc nezbytná pouze pro sestřih, ale hraje důležitou roli i při opravě poškozené DNA v savčích buňkách (Paulsen et al. 2009). Poškození tohoto faktoru tak může významnou měrou přispět k nestabilitě genomu, která je u leukemických buněk běžná. Mutace v tomto faktoru byly nalezeny u přibližně 15 % nemocných s CLL a jejich výskyt byl významně vyšší u nemocných s delecí 11q. Je tedy možné, že tyto mutace mají synergický efekt s delecí nebo poškozením genu ATM, který je v této oblasti lokalizován. Mutace v SF3B1 byly navíc nalezeny i u některých nemocných, kteří měli gen ATM mutovaný bez přítomnosti del(11q). Na rozdíl od mutací v NOTCH1 nemá tato mutace vliv na riziko transformace do Richterova syndromu (Rossi, et al. 2012b).

2.7.12. BIRC3

Sekvenování druhé generace odhalilo mutace i u proteinu BIRC3 (Baculoviral IAP repeat containing 3), který se nachází na dlouhém raménku 11. chromozómu. Hlavní funkcí BIRC3 je regulace apoptózy prostřednictvím inhibice kinázy MAP3K14, která aktivačně působí na signalizaci NF- κ B. Inhibice BIRC3 prostřednictvím mutace, popř. delece, má tak za následek zvýšení signálu MAP3K14 a následné zesílení signalizace NF- κ B vedoucí ke zvýšenému přežívání buněk (Rossi et al. 2012a).

Poškození BIRC3 bylo nalezeno u 4 % nemocných s CLL, výrazně vyšší však bylo při analýze skupiny nemocných refrakterních na léčbu fludarabinem, kde incidence dosáhla 24 %. U nemocných, jejichž choroba na léčbu reagovala, nebylo poškození BIRC3 nalezeno vůbec. Přestože poruchy BIRC3 byly nalezeny pouze u nemocných bez poškození TP53, mají tito pacienti špatnou prognózu onemocnění. Analýza poškození tohoto proteinu by tedy mohla vysvětlit podstatu špatné léčebné odpovědi řady nemocných bez postižení TP53 s možností prognostického i prediktivního využití (Rossi, et al. 2012a; Rossi et al. 2013).

2.7.13. Mutace TP53

Ve více než 75 % případů nemocných s CLL s delecí 17p je druhá alela poškozena prostřednictvím mutací menšího rozsahu (Zenz et al. 2008), které se vyskytují převážně ve 4-9 exonu a ovlivňují tak vazbu proteinu p53 na molekulu DNA (Zenz et al. 2010). U nemocných bez del(17p) se tyto mutace detekované klasickými sekvenačními metodami téměř nevyskytují. Nemocní s poškozením obou alel mají kratší celkové přežití i období do progresu než nemocní, kteří mají pouze jedno z těchto poškození. I nemocní s jedním

poškozením však mají horší prognózu než nemocní bez poškození genu TP53 (Zenz, et al. 2010).

Citlivé analýzy pomocí sekvenování nové generace (NGS), které nejsou v současné době standardně využívány, však ukazují, že pro horší prognózu postačuje přítomnost malých klonů (tzv. subklonů) obsahujících mutaci genu TP53, které standardní metoda Sangerova sekvenování není schopna detekovat. Vzhledem k nárůstu dostupnosti NGS se tedy uvažuje o jeho možném využití při stanovení prognózy nemocných s CLL (Rossi et al. 2014).

2.7.14. Role mikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou krátké (přibližně 22 nukleotidů) jednovláknové RNA regulující expresi řady genů na postranskripční úrovni pomocí ovlivňování stability transkriptu a represe translace. miRNA jsou syntetizovány v jádře pomocí DNA polymerázy II v podobě primárních miRNA (pri-miRNA) s velmi komplikovanou sekundární strukturou (Borchert et al. 2006; Lee et al. 2004a). Pri-miRNA jsou dále zpracovány pomocí RNA endonukleázového komplexu Drosha, který pri-miRNA na základě sekundárních struktur rozštěpí v oblasti RNA vlásenek a vytvoří tak přibližně 60 bází dlouhé úseky prekurzorové miRNA (pre-miRNA) tvořící dvouvláknové struktury (Zeng et al. 2005). Pre-miRNA je pomocí exportinu 5 exportována z jádra do cytoplazmy, kde je dále zpracována RNA endonukleázovým komplexem Dicer. Ten odštěpí terminální smyčku z vlásenky pre-miRNA a vytvoří tak dvouvláknovou miRNA, která je navázána na efektorový komplex RISC (RNA-induced silencing complex). Komplementární vlákno cílové miRNA je pomocí tohoto komplexu uvolněno a následně velmi rychle degradováno v cytoplazmě (Lee et al. 2002). Výsledný funkční komplex RISC využívá navázanou miRNA jako templát, který ho navádí na komplementární cílové mRNA, jejichž míru proteosyntézy reguluje (Pratt and MacRae 2009).

První prací přinášejících informace o roli miRNA u maligních onemocnění vyšla již v roce 2002 a popisovala rozdílnou expresi miRNA u nemocných s CLL. Mimo jiné ukázala, že u 68 % nemocných došlo ke snížení exprese oblasti obsahující miR-15a/miR-16-1, a že tato oblast je lokalizována na 13. chromozómu v místě 13q14 (Calin, et al. 2002). Později bylo zjištěno, že tyto miRNA umožňují indukci apoptózy prostřednictvím inhibice proteosyntézy Bcl-2 (Cimmino, et al. 2005).

Výsledky další práce potvrdily, že u nemocných s CLL rozdělených do skupin podle prognózy (mutačního stavu IGHV a exprese ZAP-70) skutečně dochází k rozdílům v expresi

těchto molekul a panel složený ze 13 z nich (miR-15a, miR-16-1, miR-16-2, miR-195, miR-221, miR-23b, miR-155, miR-223, miR-29a-2, miR-29b-2, miR-29c, miR-24-1 a miR-146) umožňuje rozlišení obou skupiny (Calin, et al. 2005). Prognostický a biologický efekt některých z nich byl následně popsán v samostatných studiích.

Jako prognostický významné byly popsány i další miRNA, např. miR-21, jejíž exprese je zvýšená u nemocných s delecí 17p a krátkým celkovým přežitím. Exprese miR-181b je snižena u nemocných špatně reagujících na léčbu a působí patrně prostřednictvím modulace exprese genu BCL-2. Snižená exprese miR-181b tak způsobuje zvýšenou produkci tohoto antiapoptotického proteinu (Rossi et al. 2010b).

U nemocných s delecí 17p a mutacemi p53 byla objevena snížená produkce miR-34a. Tato miRNA je přímým cílem proteinu p53 a snížení její exprese vede ke zvýšené rezistenci onemocnění na fludarabin (Zenz et al. 2009).

Možné prognostické využití bylo detailněji popsáno i u molekuly miR-223, jejíž snížená exprese byla v kombinaci s expresí miR-29c významně spojena s kratší dobou do zahájení léčby, kratší dobou do progresu i kratším celkovým přežitím (Stamatopoulos et al. 2009).

Narušení regulace některých klíčových signálních drah, jako je signalizace pomocí PI3K a STAT proteinů, je způsobena zvýšenou expresí miR-155, která byla v maligních lymfocytech CLL při srovnání s normálními B-lymfocyty potvrzena (di Iasio et al. 2012; Fulci et al. 2007; Zhu et al. 2012).

Agresivnější průběh CLL byl potvrzen i u nemocných se sníženou expresí miR-29 a miR-181 vedoucí ke zvýšené expresi onkogenu TCL1 (T-Cell Leukemia/Lymphoma 1) (Pekarsky et al. 2006).

MikroRNA se tak jeví jako velmi slibné prognostické ukazatele, které by bylo možné využít i v klinické praxi. Jejich exprese v čase je však velmi variabilní a metodický přístup jejich kvantifikace (včetně výběru vhodného referenčního genu pro srovnání výsledků různých analýz) zatím není jednotný a neumožňuje masivnější rozšíření analýz tohoto typu molekul. Významná role miRNA u maligních onemocnění včetně CLL navíc ukazuje, že by se v budoucnosti mohly uplatnit i v účinné terapii těchto chorob (Di Leva et al. 2012).

2.7.15. Epigenetické změny u CLL

Genetické změny v buňkách CLL hrají významnou roli ve vzniku a rozvoji tohoto onemocnění. Nemohou však vysvětlit veškerou variabilitu v jeho projevech a chování

maligních buněk. Tyto změny mohou být alespoň z části vysvětleny působením epigenetických změn, které nemění primární sekvenci DNA.

Nejlépe prostudovanou epigenetickou změnou u CLL je metylace DNA. Při ní je působením DNA metyl-transferáz přidán na 5. uhlík cytosinového cyklu v CpG dinukleotidu metylový zbytek (Baylin and Herman 2000; Bird 2002; Cedar and Bergman 2009). Oblasti CpG dinukleotidů se nevyskytují v lidském genomu náhodně. Vyskytují se v rozsáhlých repetitivních sekvencích, které jsou obvykle metylované nebo menších oblastech (tzv. CpG ostrůvcích), které se nacházejí v regulačních oblastech řady genů a metylované obvykle nejsou. Výjimku tvoří geny regulované pomocí imprintingu a geny, jejichž exprese je v dané tkáni standardně epigeneticky regulovaná.

Analýzou rozsáhlých částí genomu nemocných s CLL bylo zjištěno, že nemocní s nemutovaným IGHV mají vyšší míru metylace CpG ostrůvků (Lyko et al. 2004). Nemocní s odlišným mutačním stavem IGHV se liší i repertoárem metylovaných genů. Jedná se o řadu známých prognostických faktorů, jako jsou např. CLLU1, LPL, ZAP-70 a NOTCH1. Rozdílně metylované jsou i geny pro histon deacetylázy, které jsou odpovědné za další epigenetickou regulaci genové exprese či geny signálních drah TGF- β a NF- κ B (Cahill et al. 2013). Nemocní s vyšší mírou metylace mají i vyšší pravděpodobnost, že jejich onemocnění bude vyžadovat léčbu (Yu et al. 2007). Různé metylační profily mají i typy CLL rozdělené podle stereotypů BCR (včetně přestavby VH3-21) (Kanduri et al. 2010). Methylace DNA by tedy mohla přispívat ke špatné prognóze nemocných bez ohledu na mutační stav IGHV (Kanduri, et al. 2010). Mechanismus, jakým je to způsobeno, není dosud znám. Methylace DNA je ovlivněna i signály z mikroprostředí, ve kterém se maligní lymfocyty nacházejí, neboť po indukci maligních lymfocytů prostřednictvím CD40L, IL4 a anti-IgM protilátek došlo u těchto buněk ke zvýšení exprese LPL prostřednictvím snížení metylace DNA (Moreno et al. 2013).

Snížená metylace repetitivních sekvencí u CLL je nejčastěji spojována s aktivací protoonkogenů, genomickou nestabilitou a horší prognózou onemocnění. Bylo prokázáno, že DNA repetitivních sekvencí ALU, LINE a SAT α byla hypometylovaná u onemocnění s poškozením TP53 a agresivním průběhem. Demethylace SAT α byla dokonce potvrzena jako nezávislý prognostický znak doby do zahájení léčby (Fabris et al. 2011). Kromě již dříve objevené demethylace ornitin dekarboxylázy vedoucí k aktivaci onkogenu MYC (Lipsanen et al. 1988) umožnily moderní metody sekvenování nové generace odhalit sníženou metylaci i v regulačních oblastech řady dalších genů. Mezi takto objevené geny patří antiapoptotický gen BCL-2, gen MDR-1 zodpovědný za rezistenci na řadu léčiv a TCL1 - aktivátor signální

dráhy NF- κ B (Hanada et al. 1993; Kantharidis et al. 1997; Yuille et al. 2001). Snížená metylace promotoru byla objevena i u genu pro angiopoetin-2 (Martinelli et al. 2013).

Aktivace onkogenů pomocí demetylace není však u CLL příliš častá. Mnohem častějším jevem je inaktivace onkosupresorových genů pomocí metylace jejich regulačních oblastí. Jedním z prvních genů, jehož deregulace byla u CLL objevena je E-Cadherin, známý převážně jako inhibitor tvorby metastáz u solidních nádorů (Melki et al. 2000). V buňkách CLL byly odhaleny i další hypermetylované geny známé spíše ze solidních nádorů. Z jejich funkce u jiných malignit lze usuzovat, že jsou patrně zodpovědné za leukemogenezi u CLL. Patří mezi ně např. aberantně metylovaný SLIT2 či CRY1 (Dunwell et al. 2009; Hanoun et al. 2012). U druhého jmenovaného byla pozorována aberantní metylace u nemocných se špatnou prognózou CLL (Hanoun, et al. 2012). Zvýšená metylace byla popsána i u proapoptotického genu DAPK1, jehož mutace jsou spojovány s familiárním výskytem CLL. Hypermetylace DAPK1 byla pozorována téměř u všech případů CLL (Fulop et al. 2003; Raval, et al. 2007). Hypermetylované jsou i některé geny inhibující signalizační dráhu proteinů Wnt, která je v maligních lymfocytech CLL konstitutivně aktivována (Moskalev et al. 2012).

Metylace promotoru byla pozorována u genu HOXA4, součásti komplexu transkripčních faktorů HOXA, jejichž aberantní exprese je častá u lymfoidních malignit (Strathdee et al. 2007). Hypermetylace HOXA4 je častější u nemocných s nepříznivou prognózou CLL (Strathdee, et al. 2007).

Metylace DNA byla objevena i v regulačních oblastech genů, jejichž inhibice vede k lepší prognóze nemocných s CLL. U nemocných s mutovaným IGHV byla např. pozorována metylace genu TWIST2, který kóduje transkripční faktor inhibující syntézu p53 (Raval et al. 2005).

Studie metylace DNA z posledních let odhalily kromě postižení regulačních oblastí genů kódujících proteiny i oblasti, které regulují geny regulačních RNA, mikroRNA. Jedna z nejrozsáhlejších prací v této oblasti objevila skupinu 128 mikroRNA, které jsou aberantně metylované v maligních lymfocytech CLL, což vede ke změně exprese řady genů zodpovědných za transformaci B-lymfocytů i průběh CLL (Baer et al. 2012).

2.7.16. Role mikroprostředí

Kontakt s buňkami v kostní dřeni či sekundárních lymfatických orgánech hraje zásadní roli při proliferaci i přežívání maligních lymfocytů. Právě v těchto místech se maligní lymfocyty setkávají s antigeny, T-lymfocyty a dalšími podpůrnými buňkami (jako jsou např.

mezenchymální buňky kostní dřeně, folikulární dendritické buňky nebo z monocytů odvozené podpůrné, tzv. nurse-like, buňky) a molekulami, jako je např. CD154 (ligand receptoru CD40), BAFF či APRIL. *In vitro* provedené studie potvrdily, že maligní lymfocyty kultivované bez přidání podpůrných buněk a cytokinů podléhají apoptóze a jejich kultivace je bez dalšího zásahu, jako je např. přidání viru Epstein-Barové nemožná (Hwang et al. 2012). Ochranná role mikroprostředí je patrně zodpovědná i za nevléčitelnost CLL pomocí běžných léčebných metod. Nové terapeutické přístupy založené na narušení signálních drah aktivovaných touto komunikací se v současné době jeví jako velmi nadějně a mohly by v blízké budoucnosti znamenat další pokrok směrem k účinnější a specifitější terapii CLL.

2.7.16.1. Buňky mikroprostředí

Mikroprostředí v kostní dřeni a sekundárních lymfatických orgánech je tvořeno několika typy buněk. První, u kterých bylo prokázáno, že podporují maligní lymfocyty CLL, jsou **stromální buňky kostní dřeně** (BMSC – Bone Marrow Stromal Cells) (Panayiotidis et al. 1996). Tyto buňky, zodpovědné i za podporu normální krve tvorby, vytvářejí buňkám CLL vhodné prostředí, ve kterém jsou dostatečně vyživovány a chráněny před působením vnějších i vnitřních cytotoxických signálů. Působení BMSC na maligní lymfocyty je zprostředkováno především prostřednictvím receptoru CXCR4 a adhezivní molekuly VLA-4 a je tedy závislé na blízkosti a přímém kontaktu těchto dvou typů buněk (Burger et al. 1999; Lagneaux et al. 1998).

Dalším typem buněk nezbytným pro vývoj maligních lymfocytů jsou **podpůrné, tzv. „nurse-like“ buňky** diferencované z monocytů, které se nacházejí v sekundárních lymfatických orgánech a opět prostřednictvím přímého kontaktu chrání buňky CLL před buněčnou smrtí. Tuto funkci zprostředkovává řada ligandů pro receptory maligních lymfocytů exprimovaná na povrchu podpůrných buněk, mezi něž patří např. CXCL12, CXCL13, CD31, plexin B1, BAFF, APRIL a vimentin (Burger et al. 2000; Burkle et al. 2007; Deaglio et al. 2005; Nishio et al. 2005). Signální dráhy zodpovědné za přenos signálů v maligních buňkách jsou v posledních letech velmi intenzivně studovány a výsledky těchto studií jsou již aplikovány při navrhování nových léčebných preparátů, z nichž některé jsou zmíněny v kapitole 2.6. *Léčba*.

Proliferační centra v kostní dřeni a lymfatických uzlinách nemocných s CLL jsou z velké části tvořena **T-lymfocyty** (převážně CD4⁺) (Pizzolo et al. 1983). Tyto buňky na svém povrchu exprimují molekulu CD154, která stimuluje receptor CD40 na povrchu maligních lymfocytů, čímž aktivuje vstup těchto buněk do buněčného cyklu (Fluckiger et al. 1992).

Díky expresi řady antiapoptotických molekul jsou navíc maligní lymfocyty chráněny před buněčnou smrtí (Furman et al. 2000; Romano et al. 1998). Zvýšení exprese těchto molekul je zprostředkováno pomocí signálních kaskád zahrnujících PI3K, MAP kinázy a NF- κ B (Cuni et al. 2004). Při vzájemném kontaktu T-lymfocytů s maligními B-lymfocyty navíc nedojde k vytvoření plnohodnotné imunosenyapse, která je nezbytná pro správnou imunitní funkci T-lymfocytů, což přispívá k celkové dysfunkci imunitního systému u nemocných s CLL. Působení maligních buněk na T-lymfocyty je však mnohem výraznější. Při studiu genové exprese T-lymfocytů nemocných s CLL bylo zjištěno, že v těchto buňkách dochází k aberantní expresi celé řady genů zodpovědných za cytotoxické působení, diferenciaci, tvorbu a působení buněčných vezikulů i cytoskeletu (Gorgun, et al. 2005). Za tuto změnu je zodpovědná řada proteinů produkovaných maligními lymfocyty, jako je např. CD200, CD274 či CD276 (Ramsay and Gribben 2010).

2.7.16.2. B-buněčný receptor

Klíčovou roli při přežití a proliferaci maligních lymfocytů hraje aktivace receptoru B-lymfocytů (BCR) a následných intracelulárních signálních kaskád. BCR může být u maligních lymfocytů aktivován prostřednictvím navázání ligandu (Stevenson et al. 2011) nebo pomocí drah na ligandu nezávislých (Duhren-von Minden et al. 2012). Oligomerizace BCR vedoucí k fosforylaci tyrozinových zbytků na těchto receptorech způsobuje fosforylaci a aktivaci dalších molekul, jako jsou např. kinázy SYK, BTK a PI3K. Následné signální dráhy vedou k aktivaci MAP kináz, expresi protoonkogenu MYC, mobilizaci intracelulárního vápníku (prostřednictvím fosfolipázy C), aktivaci NF- κ B a dalších (Shaffer et al. 2012).

Nereceptorová tyrozinová kináza **SYK** hraje velmi důležitou roli v přežití jak normálních, tak maligních B-lymfocytů a účastní se regulace buněčné adheze a chemotaxe (Ganju et al. 2000; Zarbock et al. 2007). Při analýze exprese mRNA i proteinů bylo prokázáno, že v maligních lymfocytech je tato kináza exprimována více, než v normálních B-lymfocytech. V maligních lymfocytech je kináza SYK navíc konstitutivně aktivovaná fosforylací specifických tyrozinových zbytků (Buchner et al. 2009).

Brutonova tyrozinová kináza (**BTK**) je primárně exprimována hematopoetickými buňkami a B-lymfocyty (T-lymfocyty a plazmatickými buňkami exprimována není) (Genevier et al. 1994) a hraje klíčovou roli v signalizaci těchto buněk. Po aktivaci jinými tyrozinovými kinázami, jako je např. Lyn či SYK totiž prostřednictvím dalších signálních molekul zprostředkovává aktivaci transkripčních faktorů důležitých pro proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů. Kromě aktivace molekul aktivovaných prostřednictvím BCR

zprostředkovává i signály z dalších receptorů důležitých pro adhezi a migraci buněk, jako jsou např. receptory pro CXCR4 a CXCR5 či integriny (de Gorter et al. 2007; Ortolano et al. 2006; Spaargaren et al. 2003).

Významnou molekulou v buněčné signalizaci, která spojuje signály z různých receptorů je i **PI3K**, která se účastní nejen regulace signalizace prostřednictvím BCR, ale i dalších receptorů a reguluje řadu buněčných dějů včetně adheze, migrace a přežívání (Okkenhaug and Vanhaesebroeck 2003; Woyach et al. 2012). Pro regulaci dějů v B-lymfocytech je nejdůležitější isoforma PI3K δ , jejíž inhibice vede k narušení imunitní funkce a defektní signalizaci prostřednictvím BCR a CD40 (Jou et al. 2002). Zvýšená exprese PI3K byla pozorována v maligních lymfocytech pacientů s nemutovaným IGHV (Kienle, et al. 2006). Její aktivace byla v maligních lymfocytech pozorována jako následek kontaktu s mikroprostředím (Burger, et al. 1999; Edelmann et al. 2008; Longo et al. 2008).

2.7.16.3. Ostatní receptory cytokinů

Jedním z hlavních cytokinů ovlivňujících chemotaxi maligních lymfocytů je CXCL12 (označovaný též SDF-1 – Stromal cell-Derived Factor-1) produkovaný stromálními buňkami kostní dřeně (Mohle et al. 1999). Receptor CXCL12, nazývaný **CXCR4**, se nachází na povrchu maligních lymfocytů kolujících v periferní krvi. Po navázání ligandu je internalizován pomocí endocytózy, což má za následek snížení intenzity signálu a počtu receptorových molekul na membráně buněk nacházejících se ve tkáních (Burger, et al. 1999). Uvnitř buňky je signál přenášen pomocí drah využívajících SYK, BTK, PI3K, MAP kináz a STAT3 (Burger, et al. 1999; Burger, et al. 2000; Burger et al. 2005), což činí buňky citlivé vůči inhibitorům těchto molekul. Signalizace pomocí cytokinu CXCL12 je tedy zprostředkována stejnými signálními drahami jako signalizace prostřednictvím BCR a léčiva ovlivňující signalizaci prostřednictvím BCR kromě buněčné proliferace ovlivňují i migraci buněk CLL (Niedermeier et al. 2009; Ponader et al. 2012; Quiroga et al. 2009). Aktivace BCR zvyšuje senzitivitu buněk k CXCL12 a zesiluje chemotaktickou odpověď maligních lymfocytů (Quiroga, et al. 2009).

CXCR5 je membránový receptor exprimovaný zralými B-lymfocyty, některými T-lymfocyty a z pokožky derivovanými dendritickými buňkami (Muller et al. 2003). Vysoká exprese tohoto receptoru byla zaznamenána i na maligních lymfocytech CLL (Lopez-Giral et al. 2004). Ligand tohoto receptoru CXCL13 (dříve nazývaný BCA-1 – B-cell-attracting chemokine 1) produkují stromální buňky folikulů sekundárních lymfatických orgánů. CXCR5 je tedy zodpovědný za chemotaxi normálních i maligních B-lymfocytů do tohoto prostředí,

kde se buňky setkávají s antigenem (Mueller and Germain 2009) a přesné umístění těchto buněk v germinálních centrech (Allen et al. 2007). Po aktivaci CXCR5 dojde stejně jako v případě CXCR4 k internalizaci receptoru, která vede k desenzitizaci buněk k CXCL13. Intracelulární signalizace probíhá prostřednictvím malých G-proteinů a podobně jako v případě CXCL4 prostřednictvím PI3K a MAP kinázových drah (Burkle, et al. 2007).

Maligní lymfocyty na svém povrchu exprimují i receptor **CCR7** (CD197), jehož ligandy jsou molekuly CCL19 a CCL21 (Lopez-Giral, et al. 2004). Tento receptor, jehož exprese byla prokázána i na zdravých B-lymfocytech, T-lymfocytech, thymocytech a dendritických buňkách (Forster et al. 2008), je patrně zodpovědný za správné nasměrování maligních lymfocytů do lymfatických tkání. Intracelulární signalizace probíhá prostřednictvím MAP kinázových drah (Redondo-Munoz et al. 2008), PI3K a G-proteinu Rho (Cuesta-Mateos et al. 2010).

2.7.16.4. Velmi pozdní antigen 4

Integrinové membránové receptory jsou tvořeny nekovalentně vázanými heterodimery α a β podjednotek. Jedním ze členů podrodiny integrinových receptorů α je molekula CD49d, která vytváří dimery s integrinem $\beta 1$ (CD29) nebo integrinem $\beta 7$ (Berlin et al. 1993; Hemler et al. 1990). Receptor vytvořený vazbou s integrinem $\beta 7$ rozpoznává převážně adhezivní molekulu 1 mukózy tenkého střeva a je tedy zodpovědný za pohyb buněk mezi střevem a lymfoidními orgány střevní stěny (Berlin et al. 1995; Rose et al. 2002). Kombinací s molekulou CD29 dojde k vytvoření molekuly velmi pozdního antigenu 4 (Very Late Antigen 4, VLA-4), který je exprimovaný na hematopoetických kmenových a progenitorových buňkách a T- i B-lymfocytech (Hemler, et al. 1990). VLA-4 byl nalezen i na maligních lymfocytech CLL a vytváří hlavní místo výskytu CD49d na membráně cirkulujících lymfocytů (Hartmann et al. 2009). VLA-4 má dva hlavní ligandy. VCAM-1 exprimovaný na epiteliálních buňkách a stromálních buňkách kostní dřeně (Elices et al. 1990) a fibronectin, který tvoří součást extracelulární matrix (Guan and Hynes 1990).

Na rozdíl od řady jiných integrinů je afinita VLA-4 regulovatelná pomocí konformační změny receptoru. Kromě pevné vazby lymfocytů na endoteliální buňky tak VLA-4 umožňuje i tzv. rolling, kdy se lymfocyt pohybuje po vnitřní straně cévy, ale není pevně zachycen na jednom místě. Míra intenzity interakce je regulována mimo jiné chemokinem CXCL12, který produkují buňky kostní dřeně. Zvýšená afinita VLA-4 v případě vyšší koncentrace CXCL12 je velmi důležitým mechanismem pro putování lymfocytů do kostní dřeně (Peled et

al. 2000) a narušení této signalizace vede k rychlému uvolnění hematopoetických buněk do periferní krve (Rettig et al. 2012).

První práce týkající se možného prognostického využití CD49d u CLL se objevila již v roce 1996, kdy bylo prokázáno, že exprese CD49d je u pacientů s touto chorobou variabilní a je vyšší u nemocných s pokročilejšími stádii choroby (Rai III – IV) (Eksioglu-Demiralp et al. 1996). Gattei et al. v roce 2008 prokázali, že nemocní s CLL s pozitivní expresí CD49d na povrchu alespoň 30 % maligních buněk měli významně kratší dobu do zahájení léčby a celkové přežití než nemocní, kde byla tato molekula exprimována méně (Gattei et al. 2008). Tyto výsledky byly následně se stejnou hranicí prokázány v dalších studiích (Brachtl et al. 2011; Rossi et al. 2010a; Rossi et al. 2008), přestože Shanafelt et al. ve své práci ukázali, že hranice 45 % může být lepší, než 30 % (Shanafelt et al. 2008). Exprese CD49d velmi dobře koreluje i s dalšími prognostickými ukazateli, jako jsou chromozomální aberace, mutační stav IGHV, exprese CD38 a ZAP-70 (Gattei, et al. 2008; Shanafelt, et al. 2008). Ve studiích zabývajících se expresí CD49d a CD38 bylo ukázáno, že nejlepší prognózu mají pacienti s nízkou expresí obou molekul. Prognóza pacientů s vysokou expresí obou molekul byla naopak nejhorší. Samotná exprese CD38 nebo CD49d však stačila, aby prognóza pacientů byla špatná (Zucchetto et al. 2006a; Zucchetto et al. 2006b). Stanovení exprese CD49d by tak mohlo být vhodným vyšetřením odhalujícím diskordantní výsledky rozšířenějšího stanovení pouze CD38.

2.7.17. Angiogeneze

Angiogeneze je proces, při kterém je působením různých cytokinů tvořena ze stávajících cév nová vaskulatura. Angiogeneze provází řadu fyziologických jevů a její správná funkce je nezbytná již od období rané embryogeneze, účastní však i řady dalších fyziologických procesů, jako např. hojení ran apod. Patologickou angiogenezi můžeme pozorovat např. u aterosklerózy, revmatoidní artritidy a pochopitelně onkologických onemocnění. Samotný proces angiogeneze je v organismu velmi přísně kontrolován dynamickou rovnováhou mezi cirkulujícími angiogenními a antiangiogenními (angiostatickými) faktory (viz Tab. 4), kontaktem buněk s extracelulární matrix i přímým kontaktem mezi buňkami.

U solidních nádorů hraje angiogeneze zásadní roli, neboť maligní buňky jsou závislé na přísunu kyslíku a živin nezbytných pro jejich přežití (Folkman 1971). U hematologických malignit, kde se buňky nacházejí přednostně v periferní krvi, kostní dřeni či lymfatických

orgánech, se však předpokládalo, že změny angiogeneze nebudou tak důležité, neboť rozšíření cévní pleteně není pro maligní buňky nezbytné. První práce zabývající se touto problematikou se tedy začaly objevovat až o mnoho let později (Perez-Atayde et al. 1997). Role angiogenních faktorů při rozvoji hematologických malignit je stále předmětem intenzivního výzkumu. Jak ukazují práce z posledních let, je jejich úloha komplexní a kromě ovlivňování cévní stěny mají některé z nich pozitivní vliv na přežívání maligních buněk (Ferrara et al. 2003).

Tab. 4: Přehled angiogenních a antiangiogenních faktorů

Angiogenní faktory	Antiangiogenní faktory
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Angiostatin
bFGF (basic fibroblast growth factor)	Endostatin
aFGF (acidic fibroblast growth factor)	TSP-1 (trombospondin-1)
PDGF (platelet-derived growth factor)	PF4 (platelet factor 4)
TGF α (transforming growth factor α)	Restin
PGF (placental growth factor)	Canastatin
GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor)	Vasostatin
HGF (hepatocyte growth factor)	
Endoglin (CD105)	
Angiopoetin-2	

Aberantní exprese řady angiogenních faktorů byla prokázána i u CLL. Původní názory, že výskyt jejich zvýšené koncentrace je následkem vysokého množství maligních lymfocytů a zvýšená koncentrace nemá na rozvoj onemocnění vliv, je již překonaný. Nové poznatky naopak ukazují, že význam angiogeneze je klíčový a narušení angiogenních signálních drah může výrazně ovlivnit proliferaci buněk, jejich přežití i průběh onemocnění. Zvýšená propustnost stěn nově vytvářených cév výrazně usnadňuje průchod maligních lymfocytů a tyto buňky tak mohou snáze procházet do cévního řečiště a zpět do lymfoidních orgánů (Till et al. 2005). Zvýšená angiogeneze byla navíc pozorována u pacientů s pokročilejším klinickým stádiem CLL a kratší dobou přežití (Molica et al. 2002; Peterson and Kini 2001). Role jednotlivých angiogenních faktorů bude podrobněji popsána dále v textu.

2.7.17.1. Vaskulární endoteliální růstový faktor

Rodina vaskulárních endoteliálních růstových faktorů obsahuje 5 glykoproteinů: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a PlGF. Nejlépe prostudovaným z nich je VEGF-A, který je často zkráceně označován jako VEGF. Všechny tyto ligandy aktivují proliferaci endoteliálních buněk prostřednictvím navázání na specifické receptory na buněčné membráně (Otrock et al. 2007). Nejdůležitější receptor VEGF je VEGFR-2, který je exprimován na vaskulárních endoteliálních buňkách, neurálních buňkách, megakaryocytech a hematopoetických kmenových buňkách (Holmes et al. 2007). Význam VEGFR-2 v procesu angiogeneze potvrzuje skutečnost, že pro zahájení angiogenních procesů stačí aktivace pouze tohoto typu receptoru (Cao 2009; Ferrara, et al. 2003).

Po navázání VEGF na VEGFR dojde k přenosu signálu do buňky pomocí fosforylace zprostředkované intracelulárními tyrozin kinázovými doménami. Aktivace následných drah vede ke zvýšení exprese Hsp90, který váže Bcl-2, čímž se buňka stane odolnější proti signálům vedoucím ke spuštění apoptózy (Podar et al. 2001). Endoteliální buňky navíc působením VEGF zvyšují expresi růstových faktorů včetně G-CSF, GM-CSF, SCF a IL-6, což v případě hematologických malignit dále zvyšuje produkci nádorových buněk (Aguayo et al. 1999; Hussong et al. 2000). Velmi důležité pro patogenezi řady malignit je i zvýšení exprese PKC β , které bylo zjištěno i v lymfocytech CLL (Abrams et al. 2010).

Důležitá role VEGF v patogenezi CLL byla prokázána v řadě studií. V kostní dřeni nemocných s CLL byla při srovnání s normálními kontrolami zjištěna zvýšená angiogenní aktivita (Kini et al. 2000; Peterson and Kini 2001) způsobená patrně hypoxií, neboť u maligních lymfocytů CLL bylo prokázáno, že v odpovědi na hypoxii jsou schopny produkce VEGF, který stimuluje proliferaci endoteliálních buněk (Chen et al. 2000). Aktivace signálních drah VEGFR vede navíc, jak již bylo zmíněno, ke zvýšení aktivity proteinu Bcl-2 vedoucí k rezistenci leukemických buněk k apoptóze.

Vzhledem ke skutečnosti, že maligní lymfocyty CLL na svém povrchu exprimují VEGFR a zároveň jsou schopny exprese VEGF, lze předpokládat, že buňky CLL se mohou ovlivňovat sami prostřednictvím autokrinního působení. Tato teorie byla podpořena i výsledky ukazujícími, že receptory na povrchu maligních lymfocytů jsou konstitutivně fosforylovány (Lee et al. 2004b; Lee et al. 2005). Autokrinní působení VEGF u maligních lymfocytů je však patrně závislé i na dalších faktorech. Při studiu působení exogenního VEGF na subpopulace maligních lymfocytů bylo zjištěno, že buňky s vyšší expresí CD38 exprimovaly vyšší množství VEGF a přidání dalšího VEGF nemělo na míru apoptózy vliv.

U buněk s nízkou expresí CD38 došlo po přidání VEGF k výraznému útlumu této buněčné smrti (Pepper et al. 2007). Autokrinní působení VEGF má tedy patrně vliv spíše na lymfocyty s vysokou expresí CD38. Na buňky CLL působí VEGF i parakrinně. Jeden z mechanismů podpůrného působení stromálních buněk kostní dřeně na buňky CLL je právě prostřednictvím VEGF (Gehrke et al. 2011). I samotná interakce buněk CLL s mikroprostředím může stimulovat produkci VEGF maligními lymfocyty (Edelmann, et al. 2008). Dle výsledků recentního výzkumu je stimulace produkce VEGF stromálními buňkami zprostředkována nejen prostřednictvím přímého kontaktu s maligními lymfocyty, ale i prostřednictvím kontaktu s mikrovesikuly cirkulujícími v periferní krvi (Ghosh et al. 2010).

Koncentrace VEGF i VEGFR-2 je významně vyšší u nemocných ve stádiu dle Raie III-IV než u nemocných ve stádiu 0-II (Gora-Tybor et al. 2005). U nemocných, kteří po léčbě dosáhli alespoň parciální remise, byl navíc zaznamenán pokles koncentrace VEGF v séru (Gora-Tybor, et al. 2005; Smolej et al. 2007). Dle recentních výsledků by koncentrace VEGF mohla být použita k predikci času do první léčby u pacientů s časnými stádii CLL (Antic et al. 2011) a účinnosti chemoterapie a celkového přežití (Shanafelt et al. 2009).

2.7.17.2. Růstový faktor derivovaný z destiček

Růstový faktor odvozený z destiček (PDGF – Platelet Derived Growth Factor) působí jako hlavní mitogen fibroblastů, buněk hladké svaloviny a dalších typů buněk. Fyziologicky se nachází mimo jiné v α -granulích krevních destiček. Jeho hlavním působením je regulace angiogenních procesů v průběhu embryogeneze a hojení zranění. PDGF je tvořen dimery dvou prekurzorových molekul, které mohou svou kombinací vytvářet tři isoformy AA, AB a BB (Heldin and Westermark 1999; Li et al. 2000). Na membráně cílových buněk je PDGF vázán na cílové receptory α a β , které následkem navázání ligandu dimerizují a umožňují přenos signálu do buňky. Oba typy receptorů (α a β) mají poněkud odlišnou specifitu vazby isoform PDGF. Zatímco receptory α váží všechny tři, receptory β váží pouze BB (Bergsten et al. 2001; Li, et al. 2000). PDGF zvyšuje proliferaci jak normálních, tak maligních hematopoietických buněk (Katz et al. 1987; Michalevicz et al. 1986; Nara et al. 1990). Role PDGF byla prokázána i u jiných malignit (Debien et al. 2011).

Koncentrace PDGF v plazmě nemocných s CLL je vyšší než u zdravých jedinců (Ding et al. 2010). Zatímco ve fyziologických procesech se uplatňuje převážně PDGF-A, pro buněčnou diferenciaci a proliferaci maligních lymfocytů CLL je důležitý převážně PDGF-B, který je buňkami CLL exprimován (Ho et al. 2005). PDGF však nepůsobí pouze na samotné maligní lymfocyty. Ovlivňuje i migraci a proliferaci mezenchymálních buněk

kostní dřeň. Buňky CLL navíc nesou receptor PDGF na svém povrchu a PDGF, který produkují, tak může působit alespoň částečně autokrinně (Ho, et al. 2005).

2.7.17.3. Fibroblastový růstový faktor 2

Dalším důležitým angiogenním faktorem je fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2 – Fibroblast Growth Factor 2 dříve označovaný jako bFGF – basic Fibroblast Growth Factor) (Friesel and Maciag 1995). FGF-2 stimuluje buňky (včetně hematopoetických) k proliferaci a aktivuje proces angiogeneze (Bikfalvi and Han 1994). Stejně jako v případě VEGF byl u FGF-2 prokázán antiapoptotický efekt zprostředkovaný pravděpodobně prostřednictvím zvýšení exprese proteinu Bcl-2, což bylo prokázáno i u maligních lymfocytů CLL (Bairey et al. 2001; König et al. 1997). Další významnou funkcí FGF-2 v maligních lymfocytech je aktivace inhibice proteinu p53 způsobená aktivací proteinu MDM-2 (Romanov et al. 2005).

Nemocní s CLL mají vyšší koncentraci této molekuly v séru, resp. krevní plazmě (Aguayo et al. 2000; Smolej et al. 2006) a její koncentrace klesá po léčbě fludarabinem (Smolej, et al. 2007) či kladribinem (Gora-Tybor et al. 2002). U nemocných s CLL v pokročilém stádiu onemocnění byla nalezena vyšší koncentrace FGF-2 v maligních lymfocytech (Menzel et al. 1996). Prognostický význam koncentrace FGF-2 však stále nebyl zcela objasněn a zůstává spíše rozporuplný (Duensing and Atzpodien 1995; Molica et al. 2007; Smolej, et al. 2006). Velmi omezené jsou i informace o expresi mRNA pro FGF-2 v maligních lymfocytech. Celou situaci navíc komplikuje skutečnost, že exprese FGF-2 je postranskripčně regulována pomocí anti-sense molekuly transkribované z genu NUDT6 (Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 6 gene), který je kódovaný komplementárním vláknem DNA a je zodpovědný za snížení stability mRNA pro FGF-2 (MacFarlane and Murphy 2010).

2.7.17.4. Angiopoetin-2

Angiopoetinová rodina se skládá ze 4 členů, které se všechny váží na membránový receptor Tie2, jehož prostřednictvím regulují míru angiogeneze. Za normálních podmínek se na receptor váže angiopoetin-1, který udržuje endoteliální buňky v klidovém stavu, chrání je před aktivací dalšími cytokiny a působí tak antiangiogenně. V případě zahájení angiogenních procesů, např. hypoxií či působením VEGF, dojde k zahájení syntézy angiopoetinu-2 (Ang-2) a uvolnění jeho zásob z Weibel-Paladeho tělísek v endoteliálních buňkách (Burger 2010). Angiopoetin-2 následně kompetitivně vytěsňuje angiopoetin-1 z receptoru Tie-2 a buňky se stanou citlivějšími k dalším angiogenním faktorům (Maffei et al.

2010a). Pro funkci Ang-2 je velmi důležitá spolupráce s VEGF, jehož koncentrace moduluje další efekt působení Ang-2. Je-li koncentrace VEGF vysoká, dojde po destabilizaci cévních stěn prostřednictvím Ang-2 k dalšímu rozvoji angiogenetických procesů. V případě, že je koncentrace VEGF nízká, destabilizace cévních stěn vede spíše k regresi cév v dané oblasti a Ang-2 tak působí spíše antiangiogenně (Holash et al. 1999). Zvýšená exprese Ang-2 je navíc velmi důležitá pro metastatickou aktivitu některých solidních nádorů (Imanishi et al. 2011; Schulz et al. 2011).

U nemocných s CLL byla prokázána zvýšená koncentrace Ang-2 v krevní plazmě. Množství Ang-2 bylo navíc vyšší u nemocných v pokročilých stádiích dle Bineta, s nepříznivou prognózou dle cytogenetické analýzy, vysokou koncentrací β_2 -mikroglobulinu, nemutovaným IGHV a zvýšenou expresí ZAP-70 a CD38. Výsledky multivariantní analýzy navíc vedly k závěru, že množství Ang-2 v plazmě může být použito jako nezávislý prediktor času do zahájení léčby (Huttmann et al. 2006; Maffei et al. 2010b). Významně zvýšená exprese Ang-2 samotnými maligními lymfocyty byla pozorována u nemocných s nemutovaným IGHV a kratší dobou do progresu. Jedná se však spíše o ojedinělé práce na menších souborech nemocných (Maffei et al. 2007; Martinelli et al. 2008; Vrbacky et al. 2010).

2.7.17.5. Endoglin

Endoglin (CD105) je homodimerický transmembránový glykoprotein, který se vyskytuje na membráně řady typů buněk včetně aktivovaných endotelií, kde tvoří součást receptorů pro TGF β (Cheifetz et al. 1992). Endoglin není schopen TGF β vázat a nemá vlastní kinázovou doménu. Navázání a fosforylaci dalších signálních molekul zprostředkovávají molekuly samotného receptoru (Barbara et al. 1999). Endoglin pouze moduluje aktivaci drah, které vedou ke změně genové exprese a k aktivaci angiogeneze. Po navázání ligandu na receptory TGF β dojde k vytvoření heterotetrameru receptoru s kinázami ALK1 nebo ALK5, které jsou pomocí fosforylace specifických serinových a threoninových zbytků aktivovány. U klidových endoteliálních buněk převažuje aktivace ALK5, která prostřednictvím aktivace proteinu Smad-3 aktivuje expresi genů, jako je fibronectin, integrin či inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 (Bertolino et al. 2005; Bobik 2006; Lebrin et al. 2005) a naopak inhibuje aktivaci signálních molekul Smad-1 a Smad-5. Tyto molekuly jsou naopak fosforylačně aktivovány v případě fosforylace ALK1 v aktivních endoteliálních buňkách (v nichž je součástí receptoru TGF β endoglin). Jejich fosforylace vede ke snížení signalizace prostřednictvím Smad-3. Signalizace v přítomnosti endoglinu navíc

zvyšuje koncentraci Smad-2 (pravděpodobně prostřednictvím narušení jeho ubiquitinylation) a vede k intenzivnější signalizaci prostřednictvím dráhy AKT5/Smad-2 a následné zvýšené exprese endoteliální NO syntázy, jejíž správná funkce je velmi důležitá v procesu kardiovaskulární homeostázy a přestavbě cév (Santibanez et al. 2007). To vede ke zvýšené proliferaci, adhezivitě a migraci endoteliálních buněk, omezení jejich schopnosti apoptózy, ovlivnění permeability cév a zvýšení exprese řady angiogenních genů (např. ID-1, interleukin-1 receptor-like 1) a dalších molekul (Bernabeu et al. 2007; Conley et al. 2004; Li et al. 2003). Velký význam endoglinu pro správnou tvorbu cév potvrzuje i skutečnost, že mutace genu pro endoglin je známá jako příčina hereditární telangiektázie (Oslerova-Renduova-Weberova syndromu typu 1), která se vyznačuje multiorgánovou vaskulární malformací (McAllister et al. 1994).

Zvýšená exprese endoglinu na povrchu maligních buněk byla prokázána u řady onkologických onemocnění včetně hematologických malignit. U některých z nich byl prokázán statisticky významný prognostický efekt koncentrace endoglinu. V případě rakoviny prsu, ovariálního karcinomu, rakoviny prostaty či onemocnění trávicího traktu včetně adenokarcinomu tlustého střeva bylo dokonce potvrzeno, že endoglin může být ještě účinnější, než některé do té doby používané ukazatele (El-Gohary et al. 2007; Gomez-Esquer et al. 2004; Minhajat et al. 2006; Nikiteas et al. 2007; Taskiran et al. 2006). Extracelulární část endoglinového dimeru může být pomocí metaloproteinázy MMP-14 odštěpena za vzniku tzv. solubilního endoglinu (sCD105). Jeho zvýšená koncentrace v plazmě, resp. séru nemocných byla u řady maligních onemocnění pozorována také (Takahashi et al. 2001).

Dat týkajících se úlohy endoglinu u chronické lymfocytární leukémie je však velmi málo. V plazmě nemocných s CLL byla prokázána zvýšená koncentrace solubilního endoglinu ve srovnání se zdravými kontrolami. Koncentrace sCD105 byla navíc vyšší u nemocných s progresivním onemocněním a pokročilými stádii CLL. Tito nemocní měli statisticky významně kratší i dobu přežití bez progresu (Smolej et al. 2008). Rozsáhlejší práce zabývající se expresí CD105 samotnými maligními lymfocyty zcela chybí. Této problematice se věnovala pouze jediná práce, která ovšem zahrnovala velmi omezený počet nemocných a její výsledky je tedy nezbytné brát jako pilotní (Kay et al. 2002).

2.7.17.6. Matrix-metaloproteináza 9

Matrix-metaloproteináza 9 (MMP-9) je enzym štěpící molekuly kolagenu IV, který je hlavní složkou bazální membrány cévní stěny. MMP-9 je syntetizována řadou buněk, včetně buněk lymfoidních a to včetně maligních lymfocytů CLL a usnadňuje jejich schopnost

prostupovat cévní stěnou (Bergers et al. 2000; Kamiguti et al. 2004). Syntéza a sekrece MMP-9 maligními lymfocyty je ovlivňována kontaktem s mikroprostředím, ve kterém se buňka CLL nachází, neboť její zvýšení bylo pozorováno po stimulaci receptorů CXCR4 a CCL7 (Redondo-Munoz, et al. 2008). Migrace buněk CLL aktivovaná prostřednictvím MMP-9 může být navíc zastavena vysokými dávkami VEGF (Ugarte-Berzal et al. 2010). MMP-9 je maligními lymfocyty vázán prostřednictvím homopexinové domény MMP-9 na membránový komplex na povrchu lymfocytů tvořený integrinem $\alpha 4\beta 1$ a CD44v (Redondo-Munoz et al. 2010). Toto navázání má navíc za následek snížení apoptózy u buněk CLL a MMP-9 tak může působit i jako faktor zvyšující přežití maligních lymfocytů. Dle dosavadních poznatků je informace přenášena pomocí proteinů STAT-3 a Mcl-1 (Redondo-Munoz, et al. 2010).

3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

1. Zvolit vhodné kandidátní geny s možným prognostickým potenciálem u CLL.
2. Zavést vhodnou metodiku separace maligních lymfocytů z periferní krve nemocných s chronickou lymfocytární leukémií.
3. Zvolit vhodnou metodiku izolace RNA ze separovaných lymfocytů.
4. Stanovit míru exprese vybraných genů v maligních lymfocytech.
5. Zhodnotit vztah exprese vybraných genů s prognózou nemocných s CLL s využitím tradičních i moderních prognostických znaků používaných u tohoto onemocnění.
6. Zhodnotit souvislost exprese vybraných genů s klinickými parametry (období do progresu, celkové přežití).

4. Soubor nemocných a použité metodiky

4.1. Soubor nemocných

V laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové jsme v letech 2008-2015 vyšetřili 130 vzorků periferní krve neléčených nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. Diagnóza CLL byla u všech stanovena dle klasických kritérií International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) (Hallek, et al. 2008). Vzorky byly získány od nemocných, kteří byli informováni ošetřujícím lékařem a podepsali informovaný souhlas s účastí v projektu. Studie probíhala v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové.

V pilotní studii bylo vyšetřeno 33 nemocných (25 mužů a 8 žen) s mediánem věku 63 let (36-79 let) (Tab. 5). V navazující hlavní studii byly analyzovány vzorky 97 nemocných (65 mužů a 32 žen) s mediánem věku 63 let (36-84 let) (Tab. 5).

Z finančních důvodů nebylo u části nemocných, kde by to nemělo vliv na další klinický postup, provedeno stanovení mutačního stavu IGHV a chromozomálních změn metodou FISH. Vyšetření exprese CD38 a ZAP-70, která nejsou klinicky běžně využívána, byla prováděna v rámci vlastního grantu. Vyšetření bylo tedy provedeno pouze u nemocných se známou diagnózou CLL v jeho průběhu. Podrobná charakteristika rozdělení nemocných podle prognostických ukazatelů je uvedena v tabulkách 6 (pilotní studie) a 7 (hlavní studie).

Tab. 5: Charakteristika souboru nemocných.

Charakteristika	Pilotní studie	Hlavní studie
Celkový počet nemocných	33	97
Muži	25 (76 %)	65 (67 %)
Poměr muži/ženy	3,13	2,03
Medián věku (rozsah), roky	63 (36-79)	63 (36-84)

Tab. 6: Charakteristika prognostických znaků v souboru nemocných analyzovaných v pilotní studii.

Mutační stav IGHV	Mutovaný	Nemutovaný	Celkem
	10 (37 %)	17 (63 %)	27
Exprese CD38	Nízká	Vysoká	Celkem
	22 (69 %)	10 (31 %)	32
Exprese ZAP-70	Nízká	Vysoká	Celkem
	17 (53 %)	15 (47 %)	32
Riziko onemocnění dle Raie	Nízké	Střední + Vysoké	Celkem
	12 (36 %)	19 (58 %) + 2 (6 %)	33
Průběh onemocnění v době odběru	Stabilní	Progrese	Celkem
	22 (67 %)	11 (33 %)	33

Tab. 7: Charakteristika prognostických znaků v souboru nemocných analyzovaných v hlavní studii.

Mutační stav IGHV	Mutovaný	Nemutovaný	Celkem
	33 (41 %)	47 (59 %)	80
Exprese CD38	Nízká	Vysoká	Celkem
	10 (14 %)	60 (86 %)	70
Exprese ZAP-70	Nízká	Vysoká	Celkem
	44 (63 %)	26 (37 %)	70
Chromozomové přestavby	Příznivá prognóza	Nepříznivá prognóza	Celkem
	46 (64 %)	26 (36 %)	72
Riziko onemocnění dle Raie	Nízké	Střední + Vysoké	Celkem
	28 (29 %)	53 (55 %) + 16 (16 %)	97
Průběh onemocnění v době odběru	Stabilní	Progrese	Celkem
	63 (65 %)	34 (35 %)	97

4.2. Příprava kalibračních standardů pro PCR

4.2.1. Amplifikace standardu

4.2.1.1. Použité přístroje

- Blokový PCR cykler PTC-200 (MJ Research, USA)
- Box pro přípravu PCR směsí Erlab Biocap DNA/RNA (Erlab Inc., USA)
- Centrifuga Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Německo)

4.2.1.2. Použitý materiál

- cDNA s vysokou expresí vybraného genu
- Použité primery:
 - Abl1-F: ACAGGGGACACCTACACAGC
 - Abl1-R: TGCAGCAAGGTACTCACAGC
 - Ang-2-F: GGAACACTCCCTCTCGACAA
 - Ang-2-R: AAGTTGGAAGGACCACATGC
- Polymeráza Takara Ex Taq[®] Hot Start Version (Takara, Japonsko)

4.2.1.3. Popis metody

1. Připravit směs pro PCR dle rozpisu:

- | | |
|---------------------|--------|
| • H ₂ O | 9,3 µl |
| • 10x Ex Taq Buffer | 2 µl |
| • 2,5mM dNTP | 1,6 µl |
| • Směs 5µM primerů | 2 µl |
| • Takara Ex Taq HS | 0,1 µl |
| • cDNA | 5 µl |

2. Provést PCR podle programu:
 - Aktivace polymerázy: 94 °C, 2 min
 - Amplifikace (40 cyklů):
 - 94 °C, 30 s
 - 60 °C, 30 s
 - 72 °C, 30s
 - Závěrečná extenze: 72 °C, 10 min
 - Ochlazení: 4 °C, nekonečno
3. Produkt PCR reakce rozdělit pomocí elektroforézy ve 2% agarózovém gelu.

4.2.2. Extrakce DNA z agarózového gelu

4.2.2.1. Použité přístroje

- Suchý termoblok Fischer 125D (Thermo Fisher, USA)
- Centrifuga Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Německo)

4.2.2.2. Použitý materiál

- Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo)
- 100% isopropanol

4.2.2.3. Popis metody

1. Po dostatečném rozdělení oblast gelu obsahující požadovanou DNA vyříznout.
2. V mikrozkušavce zvážit vyříznutou část elektroforetického gelu.
3. Do mikrozkušavky s gelem přidat 300 µl pufru QG / 100 µg gelu.
4. Inkubovat v suchém termobloku 50 °C, 10 min. Gel se musí zcela rozpustit.
5. Přidat 100 µl isopropanolu / 100 µg původního gelu.
6. Vložit izolační kolonu do sběrné zkumavky.
7. Pipetou přenést rozpuštěný gel do kolony.
8. Centrifugovat kolonu 13000 g, 1 min při laboratorní teplotě.
9. Odsát a vyhodit kapalinu ze sběrné zkumavky.
10. Přidat do kolony 500 µl pufru QG.
11. Centrifugovat kolonu 13000 g, 1 min při laboratorní teplotě.
12. Odsát a vyhodit kapalinu ze sběrné zkumavky.

13. Přidat do kolony 750 µl pufru PE.
14. Centrifugovat kolonu 13000 g, 1 min při laboratorní teplotě.
15. Odsát a vyhodit kapalinu ze sběrné zkumavky.
16. Centrifugovat kolonu 13000 g, 1 min při laboratorní teplotě, aby se odstranil zbytkový etanol.
17. Přemístit kolonu ze sběrné zkumavky do čisté mikrozukavky.
18. Přidat do kolony přímo na křemičitou membránu 50 µl elučního pufru EB.
19. Centrifugovat kolonu 13000 g, 1 min při laboratorní teplotě.
20. Vyhodit kolonu, izolovanou DNA v mikrozukavce ihned zpracovat nebo uložit do -20 °C.

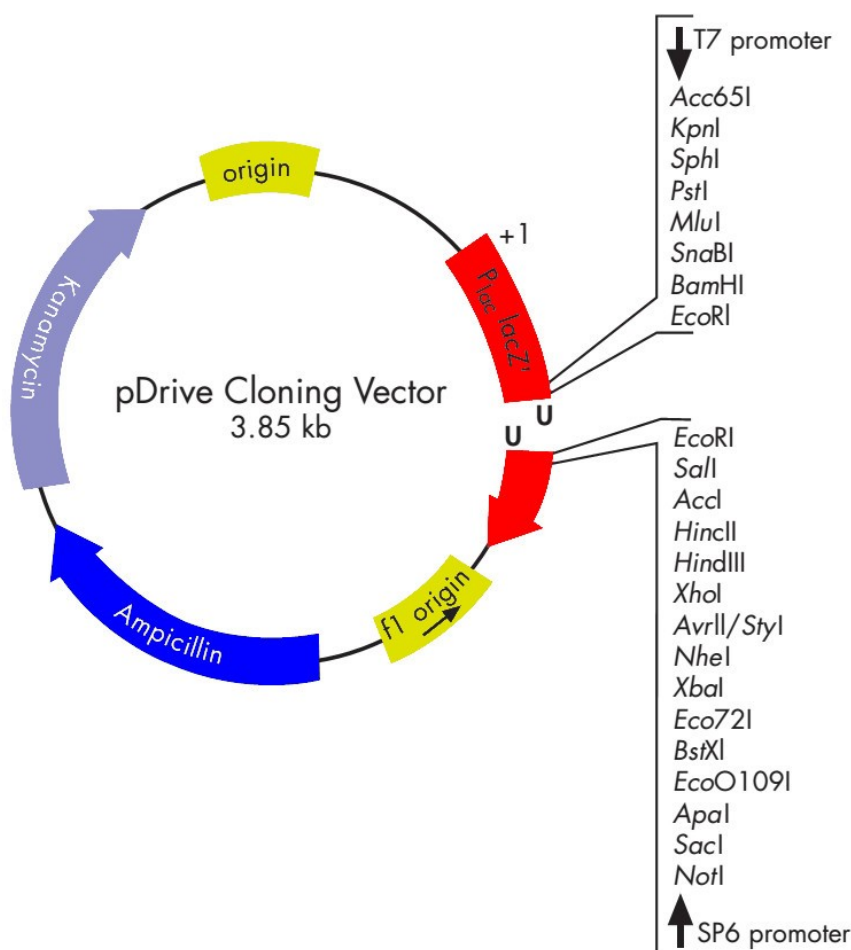
4.2.3. Klonování standardu

4.2.3.1. Použité přístroje

- Box pro sterilní práci s bakteriemi FASTER TWO 30 (Faster S.r.l., Itálie)
- Blokový PCR cykler PTC-200 (MJ Research, USA)
- Vodní lázeň v termobloku Fischer 125D (Thermo Fisher, USA)
- Biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká Republika)
- Termostatická třepačka CERTOMAT® IS (Sartorius AG, Německo)

4.2.3.2. Použitý materiál

- Produkt PCR reakce extrahovaný z gelu
- Souprava pro T-A klonovací techniky QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit (Qiagen, Německo). Součástí soupravy jsou i:
 - kompetentní bakterie *Escherichia coli* QIAGEN EZ Competent Cells: [F':::Tn10(Tc^r) proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15] recA1 end A1 hsdR17(r_{K12}-m_{K12}⁺) lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA1
 - Vektor pDrive (viz. Obr. 2)



Obr. 2: Mapa vektoru pDrive. Převzato z originálního návodu k soupravě QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit (Qiagen, Německo).

- Ledová tříšť
- Čerstvě připravené 9cm Petriho misky s LB médiem obsahující selekční antibiotikum, IPTG a X-Gal dle rozpisu (na 1 litr):
 - 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl a 15 g agaru rozpustit do celkového objemu 950 ml vody, nastavit pH = 7 a doplnit do 1000 ml.
 - Vyklávkovat 120 °C, 15 min
 - Po zchladnutí na přibližně 55 °C přidat 1 ml zásobního roztoku Ampicilinu (100 mg/ml), 2 ml zásobního roztoku X-Gal (40 mg/ml) a 0,5 ml zásobního roztoku IPTG (100 mM).
 - Vše nalít do sterilních Petriho misek, nechat zatuhnout a ihned použít nebo uložit do chladničky na dobu maximálně 1 týdne.
- Čerstvě připravené LB médium s ampicilinem:

- 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl rozpustit do celkového objemu 950 ml vody, nastavit pH = 7 a doplnit do 1000 ml.
- Vyklávkovat 120 °C, 15 min.
- Sterilní médium je možné skladovat dlouhodobě v chladničce.
- Před použitím (nebo po zchladnutí na alespoň 55 °C) přidat 1ml zásobního roztoku Ampicilinu (100 mg/ml) na litr média.
- Médium s Ampicilinem ihned použít nebo uložit do chladničky na dobu maximálně 1 týdne.

4.2.3.3. Popis metody

1. Na ledu rozmrazit 2x Ligation master mix, plazmid pDrive a vodu ze soupravy QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit.
2. Namíchat ligační směs dle rozpisu:
 - H₂O 2 µl
 - pDrive (50 ng/µl) 1 µl
 - Produkt PCR 2 µl
 - Ligation Master Mix 5 µl
3. Směs opatrně promíchat pipetou.
4. Inkubovat 10 °C, 30 min v PCR cykleru.
5. Na ledu rozpustit QIAGEN EZ Competent Cells.
6. Ihned po rozmražení k buňkám přidat 2 µl ligační směsi a krouživým pohybem pipetovací špičky vše promíchat.
7. Inkubovat buňky 5 min v ledové tříšti.
8. Inkubovat buňky 30 s ve vodní lázni ohřáté na 42 °C.
9. Inkubovat buňky 2 min v ledové tříšti.
10. Přidat k buňkám 250 µl SOC média ohřátého na laboratorní teplotu.
11. Ihned rozprostřít 20 µl a 100µl transformovaných bakterií na Petriho misky s LB agarem s Ampicilinem, X-Gal a IPTG. Nechat veškerou kapalinu vsáknout do agaru.
12. Kultivovat bakterie v biologickém termostatu při 37 °C 15 – 18 hodin v Petriho miskách v pozici dnem vzhůru.
13. Uložit misky dnem vzhůru alespoň na 2 hodiny do chladničky (zvýrazní se modrá barva kolonií bez inzertu).
14. Provést inokulaci 3 ml tekutého LB média s Ampicilinem klonem bakterií z jedné dobře oddělené bílé kolonie na Petriho misce.

15. Kultivovat buňky 12 hodin v třepačce při 37 °C.

4.2.4. Izolace plazmidů

4.2.4.1. Použité přístroje

- Centrifuga Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Německo).
- Spektrofotometr Implen NanoPhotometer® (Implen, Německo)

4.2.4.2. Použitý materiál

- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo)

4.2.4.3. Popis metody

1. Třepanou kulturu rozpipetovat do 3 mikrozkušavek.
2. Centrifugovat 7000 g, 3 min při laboratorní teplotě.
3. Odsát a vyhodit supernatant.
4. Důkladně resuspendovat postupně všechny 3 sedimenty ve 250 µl pufru P1.
5. Přidat 250 µl pufru P2 a pořádně zamíchat 5x otočením dnem vzhůru.
6. Přidat 350 µl pufru N3 a ihned zamíchat 5x otočením dnem vzhůru.
7. Centrifugovat 14000 g, 10 min při pokojové teplotě.
8. Supernatant nanést na izolační kolonu.
9. Centrifugovat 14000 g, 60 s při laboratorní teplotě.
10. Odsát a vyhodit supernatant.
11. Nanést na kolonu 500 µl pufru PB.
12. Centrifugovat 14000 g, 60 s při laboratorní teplotě.
13. Odsát a vyhodit supernatant.
14. Nanést na kolonu 750 µl pufru PE.
15. Centrifugovat 14000 g, 60 s při laboratorní teplotě.
16. Odsát a vyhodit supernatant.
17. Ještě jednou centrifugovat 14000 g, 60 s při laboratorní teplotě.
18. Dát kolonu do čisté 1,5ml mikrozkušavky.
19. Nanést doprostřed křemičité membrány 100 µl elučního pufru EB a inkubovat 1 min.
20. Centrifugovat 14000 g, 60 s při laboratorní teplotě.
21. Kvantitu a kvalitu DNA ověřit spektrofotometrem.

4.3. Separace mononukleárních buněk

4.3.1. Použité přístroje

- Programovatelná rotační míchačka zkumavek Multi Bio RS-24 (Biosan, Lotyšsko)
- Box pro práci ve sterilním prostředí Jouan MSC 12 (Thermo Fisher, USA)
- Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Německo)
- Automatický hematologický analyzátor Sysmex XE-2100 (Sysmex, Japonsko)

4.3.2. Použitý materiál

- Periferní krev odebraná do zkumavky s K₃EDTA
- Sterilní roztok PBS:
 - NaCl 8,0 g/l
 - KCl 0,2 g/l
 - Na₂HPO₄ 1,44 g/l
 - KH₂PO₄ 0,24 g/l
 - Nastavit pH na hodnotu 7,4 pomocí HCl.
- Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA)

4.3.3. Popis metody

1. Vzorek periferní plné krve nechat důkladně promíchat na rotační míchačce zkumavek.
2. Do 15ml centrifugační zkumavky nachystat 5 ml Ficoll-Paque Plus.
3. Krev velmi opatrně navrstvit na připravený Ficoll-Paque Plus.
4. Zkumavku s navrstvenou krví na Ficoll-Paque Plus centrifugovat 30 minut, 400 g, 20 °C se snížením brzděním centrifugy.
5. V mezidase si připravit další sterilní 15ml zkumavku s 3 ml PBS.
6. Po centrifugaci a odsátí plazmy opatrně pomocí pasteurovy pipety odebrat vrstvu oddělených separovaných buněk, přemístit je do připravené zkumavky s PBS a důkladně resuspendovat.
7. K resuspendovaným buňkám přidat takové množství roztoku PBS, aby celkový výsledný objem byl 10 ml.
8. Z 10 ml odebrat 500 µl do 1,5ml mikrozukumavky Eppendorf.

9. Zbylých 9,5 ml resuspendovaných buněk centrifugovat 10 minut, 250 g, 20 °C se sníženým brzděním centrifugy.
10. Z 0,5ml suspenze z bodu 8. stanovit krevní obraz a diferenciální počet leukocytů na automatickém hematologickém analyzátoru Sysmex XE-2100 pro stanovení počtu bílých krvinek.
11. Na základě získaného počtu leukocytů spočítat objem výsledné buněčné suspenze tak, aby obsahovala 10^7 buněk/ml, což je optimální koncentrace buněk pro následnou izolaci RNA.
12. Po centrifugaci odsát přebytečný supernatant. Na základě výpočtu z bodu 10. resuspendovat sediment do odpovídajícího objemu PBS.

4.4. Izolace RNA pomocí silikátových kolon

4.4.1. Použité přístroje

- Rotační míchačka (vortex) IKA MS2 (IKA, Německo)
- Box pro práci ve sterilním prostředí Jouan MSC 12 (Thermo Fisher, USA)
- Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Německo)

4.4.2. Použitý materiál

- Buněčná suspenze separovaných buněk o koncentraci 10^7 buněk/ml
- High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Německo)

4.4.3. Popis metody

1. Do čisté mikrozkušavky připravit 200 μ l buněčné suspenze.
2. K buněčné suspenzi přidat 400 μ l Lysis/Binding Buffer. POZOR!!! Pufr je velmi viskózní. Je zapotřebí opatrně nasávat i vypouštět!!!
3. Směs promísit pomocí vortexu 1800 ot./min., 15 s. Po zamíchání nesmí být vidět nehomogenita. V případě nehomogenity směs opatrně promíchat pipetou.
4. Sestavit izolační kolonu.
5. Do horní části kolony napipetovat lyzované buňky.
6. Kolonu centrifugovat 8000 g, 15 s při laboratorní teplotě.
7. Pipetou odsát a vyhodit kapalinu ze záchytné zkumavky.
8. Kolonu vsadit zpět.
9. Do zvláštní mikrozkušavky připravit směs 90 μ l DNase Incubation Buffer a 10 μ l rekonstituované DNase I na 1 vzorek izolace RNA.
10. 100 μ l naředěné DNaseI napipetovat opatrně do kolony přímo na bílé síto.
11. Nechat inkubovat 15 min při laboratorní teplotě.
12. Do kolony přidat 500 μ l pufru Wash Buffer I.
13. Centrifugovat 8000 g, 15 s při laboratorní teplotě.
14. Pipetou odsát a vyhodit kapalinu ze záchytné zkumavky.
15. Do kolony přidat 500 μ l pufru Wash Buffer II.
16. Centrifugovat 8000 g, 15 s při laboratorní teplotě.
17. Pipetou odsát a vyhodit kapalinu ze záchytné zkumavky.

18. Do kolony přidat 200 µl pufru Wash Buffer II.
19. Centrifugovat 13000 g, 15 s při laboratorní teplotě.
20. Kolonu zasunout do sterilní mikrozkušavky Eppendorf a záchytnou zkumavku s kapalinou vyhodit.
21. Do kolony přidat 100 µl pufru Elution Buffer.
22. Centrifugovat 8000 g, 1 min při laboratorní teplotě.
23. Eluovanou RNA v mikrozkušavce přepipetovat do čisté sterilní mikrozkušavky a okamžitě zamrazit v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5. Reverzní transkripce celkové RNA pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit

4.5.1. Použité přístroje

- Box pro přípravu PCR směsí Erlab Biocap DNA/RNA (ErLab Inc., USA)
- Suchý termoblok Fischer 125D (Thermo Fisher, USA)
- Centrifuga Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Německo)

4.5.2. Použitý materiál

- Izolovaná RNA
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo)
- Stojan pro mikrozkušavky Eppendorf PCR-Cooler (Eppendorf, Německo)

4.5.3. Popis metody

1. RNA rozmrazit v předchlazeném bločku Eppendorf PCR-Cooler.
2. Z kitu pro reverzní transkripci připravit směs podle rozpisu (v případě více paralelních reakcí připravit mastermix a následně ho rozpipetovat do jednotlivých mikrozkušavek):
 - RNA 5 µl
 - Oligo(dT)₁₈ 1 µl
 - H₂O 7 µl
3. V polystyrenové nádobě připravit vodní lázeň o teplotě 65 °C.
4. Směs oligo(dT) s RNA denaturovat při 65 °C 10 min ve vodní lázni.
5. Z dalších reagentů připravit v předchlazeném bločku PCR-Cooler mastermix podle rozpisu:
 - Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer Pufr 4 µl
 - Protector RNase Inhibitor 0,5 µl
 - Deoxynucleotide Mix 2 µl
 - Transcriptor Reverse Transcriptase 0,5 µl
6. Denaturovanou RNA zchladit v předchlazeném bločku Eppendorf PCR-Cooler.
7. K RNA rozpipetovat připravený mastermix.

8. Zkumavky inkubovat v suchém termobloku při teplotě 50 °C 60 min.
9. Reakci zastavit přendáním mikrozkušavek do připravené vodní lázně 85 °C na dobu 5 min.
10. Zkumavky s cDNA otřít, centrifugovat v příruční centrifuze a zchladit v bločku Eppendorf PCR-Cooler.
11. cDNA zmrazit při -20 °C.

4.6. Kvantifikační PCR pomocí univerzální knihovny sond

4.6.1. Použité přístroje

- PCR cykler LightCycler® 1.5 (Roche, Německo)
- Software LightCycler® Software Version 5.32 (Roche, Německo)
- Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Německo)
- Rotační míchačka IKA MS2 (IKA, Německo)

4.6.2. Použitý materiál

- Templátová cDNA
- Plazmidové standardy o koncentraci 10^9 kopií/ μ l
- TE pufr (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH = 8)
- Použité primery:
 - Abl1-F: GAGAAGGACTACCGCATGGA
 - Abl1-R: GGGATTCCACTGCCAACAT
 - Ang-2-F: CACGTTAACATTCCCTAATTCTACAG
 - Ang-2-R: CTCACGTCGCTGAATAATTGTC
- Použité sondy:
 - Abl1: Universal ProbeLibrary Probe #44 (Roche, Německo)
 - Ang-2: Universal ProbeLibrary Probe #25 (Roche, Německo)
- LightCycler® TaqMan® Master (Roche, Německo)

4.6.3. Popis metody

1. Rozmrazit aliquot standardů o koncentraci 10^9 kopií/ μ l.
2. Postupným ředěním do TE pufru připravit ředící řadu kalibrátorů o koncentracích 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 a 10^2 / μ l.

3. Do čisté mikrokumavky připravit reakční směs dle rozpisu na jeden vzorek:
 - H₂O 10 µl
 - 5µM Primery 2 µl
 - 1µM UPL sonda 2 µl
 - Master Mix 4 µl
4. Reakční směs řádně promíchat a rozpipetovat po 18 µl do kapilár pro LightCycler® 1.5.
5. Do kapilár přidat 2 µl templátu (vše včetně kalibrátorů analyzovat v dubletu).
Do poslední kapiláry přidat pouze vodu (kontrola bez templátu).
6. Kapiláry v centrifugačních adaptorech centrifugovat 5 s, 600 g při laboratorní teplotě.
7. Vložit kapiláry do cykleru.
8. Provést PCR podle programu:
 - Inkubace s UDG: 40 °C, 2 min
 - Aktivace enzymu: 95 °C, 10 min
 - Amplifikace (45 cyklů):
 - 95 °C, 10 s
 - 60 °C, 30 s
 - 72 °C, 1 s
 - Ochlazení (30 s, 40 °C)
9. Odečíst body křížení (Crossing Point) v software LightCycler® Software 5.32 pomocí metody „Second Derivative Maximum Method“.

4.7. Separace CD19⁺ buněk z plné krve a příprava buněčných lyzátů

4.7.1. Použité přístroje

- Programovatelná rotační míchačka zkumavek Multi Bio RS-24 (Biosan, Lotyšsko)
- Box pro práci ve sterilním prostředí Jouan MSC 12 (Thermo Fisher, USA)
- Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Německo)
- Automatický hematologický analyzátor Sysmex XE-2100 (Sysmex, Japonsko)

4.7.2. Použitý materiál

- Periferní krev odebraná do zkumavky s K₃EDTA
- Roztok PBS s 2 % fetálního bovinního séra (StemCell Technologies, USA)
- RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, USA)
- Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA)
- TRIzol Reagent (Invitrogen, USA)

4.7.3. Popis metody

1. Vzorek periferní krve pacientů nechat důkladně promíchat na rotační míchačce zkumavek.
2. Připravit si dostatečný objem (25 ml) PBS s 2 % fetálního bovinního séra (dále jen PBS/FBS) a 5 ml Ficoll-Paque Plus tak, aby se zahřály před použitím na laboratorní teplotu.
3. Z důkladně promíchané zkumavky odebrat 5 ml krve a přenést do 15ml sterilní zkumavky s víčkem.
4. Ke krvi přidat 250 µl RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (dále jen RosetteSep) a tuto směs dobře promíchat opakovaným nasátím a vypuštěním ze sterilní pasteurovy pipety.
5. Nechat směs inkubovat při laboratorní teplotě 20 minut (každých 5 minut opatrně a krátce promíchat krouživým pohybem zkumavky). Během této inkubační doby dochází k vazbě nechtěných buněk plné krve na erytrocyty pomocí tetramerických protilátkových komplexů obsažených v RosetteSep a k tvorbě tzv. rozet.

6. Po uplynutí doby inkubace naředit krev s RosseteSep roztokem PBS/FBS o laboratorní teplotě v poměru 1:1, směs opatrně promíchat a velmi opatrně navrstvit na připravený Ficoll-Paque Plus o laboratorní teplotě.
7. Zkumavku s navrstvenou krví centrifugovat 30 minut, 400 g, 20 °C se snížením brzděním centrifugy.
8. V mezičase si připravit další sterilní 15ml zkumavku s 3 ml Ficoll-Paque Plus.
9. Po centrifugaci a odsátí plazmy opatrně pomocí pasteurovy pipety odebrat vrstvu oddělených separovaných buněk, přemístit je do připravené zkumavky s Ficoll-Paque Plus a důkladně resuspendovat.
10. K resuspendovaným buňkám přidat takové množství roztoku PBS/FBS, aby celkový výsledný objem byl 10ml.
11. Z 10 ml odebrat 500 μ l do 1,5ml mikrozkušavky.
12. Zbylých 9,5 ml resuspendovaných buněk centrifugovat 10 minut, 250 g, 20 °C se sníženým brzděním centrifugy.
13. Z 0,5ml suspenze z bodu 11. stanovit krevní obraz a diferenciální počet leukocytů v automatickém hematologickém analyzátoru Sysmex XE-2100 pro stanovení počtu bílých krvinek.
14. Na základě získaného počtu leukocytů spočítat objem výsledné buněčné suspenze tak, aby obsahovala 35×10^6 buněk v 15 μ l, což je optimální koncentrace buněk pro lyzování v TRIzol Reagentu.
15. Po centrifugaci odsát přebytečný supernatant. Na základě výpočtu z bodu 14. nasát do plastové pasteurovy pipety odpovídající objem PBS/FBS o laboratorní teplotě a resuspendovat v něm sediment. Vše důkladně promíchat, celou tuto suspenzi přenést do mikrozkušavky a změřit skutečný objem suspenze.
16. Spočítat přesný objem suspenze obsahující 35×10^6 buněk a tento objem napipetovat do 4 připravených mikrozkušavek.
17. Mikrozkušavky doplnit do 1 ml TRIzol Reagent, ihned po přidání reagentu směs důkladně (15x) nasát do pipetovací špičky tak, aby se buňky kompletně rozpustily.
18. Nechat buňky kompletně lyzovat 4 minuty při laboratorní teplotě a dát zamrazit při -80 °C do další analýzy.

4.8. Izolace celkové RNA

4.8.1. Použité přístroje

- Box pro práci ve sterilním prostředí Jouan MSC 12 (Thermo Fisher, USA)
- Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Německo)
- Rotační míchačka IKA MS2 (IKA, Německo)
- Suchý termoblok Fischer Scientific Isotemp 125D (Thermo Fisher, USA)

4.8.2. Použitý materiál

- Buněčný lyzát
- Chloroform
- 100% isopropanol
- 75% etanol (ve vodě ošetřené dietylpYROKARBONÁTEM – DEPC)
- Voda zbavená RNáz

4.8.3. Popis metody

1. Rozmrazit připravené buněčné lyzáty.
2. Přidat 200 µl chloroformu.
3. Zavřít mikrozkušavku a intenzivně s ní 15 sekund ručně třepat.
4. Suspenzi inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě.
5. Centrifugovat vzorek 12000 g, 15 min, 4 °C.
6. Po centrifugaci odebrat opatrně horní bezbarvou vodnou fázi a přenést ji do nové mikrozkušavky pro následnou izolaci RNA.
7. K vodné fázi přidat 500 µl 100% isopropanolu a špičkou směs zamíchat.
8. Inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě.
9. Centrifugovat vzorek 12000 g, 10 min, 4 °C.
10. Po centrifugaci opatrně odsát z mikrozkušavky všechny supernatant.
11. Do mikrozkušavky k peletě RNA přidat 1 ml 75% etanolu. RNA může být v 75% etanolu uchována při – 20 °C jeden rok nebo při 4 °C jeden týden.
12. Promíchat mikrozkušavku krátce pomocí rotační míchačky.
13. Centrifugovat 7500 g, 5 min, 4 °C.

14. Odstranit supernatant a vysušit peletu RNA po dobu 5 – 10 minut. Dávat dobrý pozor, aby se nevysušila úplně (zprůhlední). Zásadně tím klesne její rozpustnost.
15. RNA peletu resuspendovat v 30 μ l vody zbavené RNáz pomocí opakovaného nasátí a vytlačení ze špičky pipety.
16. Inkubovat mikrozkušavku v suchém termobloku 10 minut při teplotě 55 °C.
17. Po inkubaci vzorek ihned použít nebo uchovat při –80 °C.

4.9. Reverzní transkripce celkové RNA pomocí SuperScript III First-Strand Synthesis System

4.9.1. Použité přístroje

- Box pro přípravu PCR směsí Erlab Biocap DNA/RNA (Erlab Inc., USA)
- Blokový PCR cykler PTC-200 (MJ Research, USA)
- Centrifuga Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Německo)

4.9.2. Použitý materiál

- Izolovaná RNA
- Ledová lázeň
- SuperScript III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen, USA)

4.9.3. Popis metody

1. Před použitím je potřeba každou komponentu reakce promíchat na vortexu a krátce centrifugovat.
2. Do čisté sterilní mikrokumavky připravit reakční směs A dle následujícího rozpisu (na 1 vzorek):
 - Celková RNA (5 ng) 5 μ l
 - Oligo(dT)₂₀ (50 μ M) 1 μ l
 - směs dNTP (10 mM) 1 μ l
 - voda ošetřená DEPC 3 μ l
3. Inkubovat 5 minut při teplotě 65 °C (denaturace).
4. V mezichase připravit do další čisté sterilní mikrokumavky reakční směs dle následujícího rozpisu (na 1 vzorek):
 - RT pufr (10x) 2 μ l
 - MgCl₂ (25 mM) 4 μ l
 - DTT (0,1 M) 2 μ l
 - RNaseOUT (40 U/ μ l) 1 μ l
 - SuperScript III RT (200 U/ μ l) 1 μ l
5. Směs z bodu 3. schladit na ledu po dobu 1 minuty.

6. 10 μ l reakční směsi z bodu 4. přidat ke zchlazené denaturované RNA.
7. Směs promíchat a krátce centrifugovat.
8. Inkubovat 50 minut při teplotě 50 °C (syntéza cDNA).
9. inkubovat 5 minut při teplotě 85 °C (zastavení reakce).
10. Schladit na ledu.
11. Krátce centrifugovat, přidat 1 μ l RNázy H a inkubovat 20 minut při teplotě 37 °C (odstranění RNA z heteroduplexu DNA/RNA).
12. cDNA ihned použít nebo uchovat při – 20 °C.

4.10. Kvantitativní PCR v termocykleru RotorGene 6000

4.10.1. Použité přístroje

- Termocykler Rotor Gene 6000 (Qiagen, Německo)
- Box pro přípravu PCR směsí Erlab Biocap DNA/RNA (Erlab Inc., USA)
- Centrifuga Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Německo)
- Rotační míchačka IKA MS2 (IKA, Německo)

4.10.2. Použitý materiál

- Templátová cDNA
- TaqMan Gene Expression Master Mix kit (Life technologies, USA)
- Směsi primerů a sond (vše od Life Technologies, USA)
 - Ang-2: TaqMan® Gene Expression Assays (angiopoietin 2): Hs01048042_m1
 - CD105: TaqMan® Gene Expression Assays (endoglin): Hs00923996_m1
 - FGF-2: TaqMan® Gene Expression Assays (FGF2): Hs00266645_m1
 - NUDT6: TaqMan® Gene Expression Assays, (Nudix): Hs00246601_m1
 - HPRT1: Human HPRT1 (HGPRT) Endogenous Control (FAM / MGB Probe, Non-Primer Limited)

4.10.3. Popis metody

1. Rozmrazit všechny komponenty potřebné pro reakci a uchovat je v chladničce do doby použití.
2. Rozmrazit vzorky cDNA připravené k analýze a normalizační standardy pro analýzu pomocí $\Delta\Delta C_t$ metody.
3. Těsně před použitím každou komponentu reakce promíchat na rotační míchačce a dle potřeby krátce centrifugovat.
4. V chladícím bloku si připravit reakční směs pro PCR dle následujícího rozpisu (pro 1 vzorek):
 - TaqMan Gene Expression Master Mix (2x) 10 μ l
 - Směs primerů a sondy (20x) 1 μ l
 - Voda o čistotě pro PCR 7 μ l

5. Připravenou reakční směs opatrně ale pečlivě zamíchat a napipetovat po 18 μ l do připravených reakčních mikrozkušavek.
6. Do jednotlivých mikrozkušavek přidat 2 μ l cDNA vzorků či normalizačních standardů. Do zkušavky s negativní kontrolou přidat místo cDNA 2 μ l vody o čistotě pro PCR. Opatrně každou mikrozkušavku promíchat.
7. Vložit všechny mikrozkušavky do termocykleru Rotor Gene 6000 a spustit program dle rozpisu:
 - Inkubace s UDG: 50 °C, 2 min
 - Aktivace polymerázy: 95 °C, 10 min
 - Amplifikace (40 cyklů):
 - Denaturace: 95 °C, 15 sec
 - Nasednutí primerů/elongace: 60 °C, 1 min (s odečtem fluorescence v kanálu pro FAM)
8. Vyhodnotit data pomocí software Rotor Gene 6000 Series (verze 1.7 - build 87) dodávaným přímo s termocyklerem Rotor Gene 6000 v módu „Quantitation“.
9. Provést analýzu relativní kvantifikace $\Delta\Delta C_t$ pomocí programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., USA).

4.11. Stanovení exprese molekuly CD38

4.11.1. Použité přístroje

- Průtokový cytometr Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, USA)
- Analyzační software Flow Jo (Tree Star, Inc., USA)

4.11.2. Použitý materiál

- Protilátky:
 - CD5-FITC (Beckman Coulter, USA)
 - CD19-PC5 (Beckman Coulter, USA)
 - CD38-PE (Beckman Coulter, USA)
- Izotypová kontrola IgG1-PE (Beckman Coulter, USA)
- Lyzační roztok OptiLyse C (Beckman Coulter, USA)

4.11.3. Popis metody

Detekce byla prováděna na Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK dle následujícího postupu:

1. 25 μ l periferní krve (1×10^6 buněk/ml) inkubovat (15 minut, 18-25 °C) s 5 μ l příslušných monoklonálních protilátek (CD5-FITC, CD19-PC5, CD38-PE nebo IgG1-PE).
2. Červené krvinky lyzovat pomocí inkubace s lyzačním roztokem (10 minut, 18-25 °C).
3. Vzorky promýt a analyzovat průtokovým cytometrem.
4. Hranici positivity stanovit dle izotypové kontroly. Pozitivita v izotypové kontrole nesmí být vyšší než 1 %.
5. Hodnotu exprese CD38 analyzovat v populaci CD5⁺/CD19⁺ buněk CLL s hranicí positivity nastavenou dle izotypové kontoly. Hodnotit minimálně 25 000 CD5⁺/CD19⁺ buněk. Vzorek je CD38 pozitivní, pokud je signál pozitivní na více než 30 % analyzovaných buněk.

4.12. Stanovení exprese molekuly ZAP-70

4.12.1. Použité přístroje

Průtokový cytometr Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, USA)

Analyzační software Flow Jo (Tree Star, Inc., USA)

4.12.2. Použitý materiál

- Protilátky:
 - ZAP-70-PE, klon 1E7.2 (Caltag Laboratories, USA)
 - CD3-FITC (Beckman Coulter, USA)
 - CD5-FITC (Beckman Coulter, USA)
 - CD19-PC5 (Beckman Coulter, USA)
- Izotypová kontrola IgG1-PE (Beckman Coulter, USA)
- Permeabilizační a fixační činidlo IntraPrep Permeabilization reagent (Beckman Coulter, USA)
- Lyzační roztok OptiLyse C (Beckman Coulter, USA)

4.12.3. Popis metody

Detekce byla prováděna na Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK dle následujícího postupu:

1. 25 μ l periferní krve (1×10^6 buněk/ml) inkubovat (15 minut, 18-25 °C) s 5 μ l příslušných monoklonálních protilátek proti povrchovým znakům (CD3-FITC, CD19-PC5).
2. Fixovat buňky (18-25 °C, 15 min.) s činidlem 1 (reagent 1, IntraPrep).
3. Po promytí permeabilizovat membrány buněk inkubací (15 minut, 18-25 °C) s činidlem 2 (reagent 2, IntraPrep).
4. Označit intracelulární molekulu ZAP-70 inkubací s 5 μ l příslušné monoklonální protilátky (ZAP70-PE nebo IgG1-PE).
5. Po proběhlé inkubaci (15 minut, 18-25 °C ve tmě) buňky promýt a okamžitě analyzovat průtokovým cytometrem.
6. Hranici positivity stanovit dle izotypové kontroly. Pozitivita v izotypové kontrole nesmí být vyšší než 1 %.

7. Hodnotu exprese ZAP-70 analyzovat v populaci CD5/CD19⁺ buněk s hranicí positivity nastavenou dle izotypové kontoly. Hodnotit minimálně 25 000 CD5/CD19⁺ buněk. Vzorek je pozitivní, pokud je signál pozitivní na více než 20 % analyzovaných buněk.

4.13. Vyšetření mutačního stavu IGHV

Mutační stav IGHV byl servisně vyšetřován na oddělení lékařské hematologie, biochemie a imunologie Nemocnice Na Homolce a v laboratořích Chambon Praha standardním postupem (Pekova et al. 2005) dle schématu:

1. Z každého vzorku periferní krve separovat mononukleární buňky pomocí Ficol PaqueTM (Sigma, USA).
2. Ze separovaných buněk izolovat RNA pomocí TRIzol Reagent (Invitrogen, USA).
3. Z RNA připravit cDNA reverzní transkriptázou Superscript II (Invitrogen, USA) s náhodnými hexanukleotidovými primery.
4. Metodou PCR se specifickými primery namnožit oblast VH genů.
5. Sangerovým sekvenováním s následnou analýzou v software Chromas verze 1.5 (Technelysium, Austrálie) analyzovat sekvenci maligního klonu.
6. Pomocí služby IgBLAST (dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) analyzovat míru odlišnosti sekvence maligního klonu od zárodečné DNA. Geny byly považovány za mutované, pokud byla jejich homologie se zárodečnou linií nižší než 98 % (Hamblin, et al. 1999).

4.14. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení testu χ^2 , neparametrického Mann-Whitney U testu i křivek přežití bylo stejně jako grafické znázornění dat pomocí bodových a krabicových grafů provedeno ve statistickém prostředí R (R Core Team 2014). Křivky přežití byly konstruovány dle Kaplan-Meierovy metody. Ke stanovení rozdílu v přežití byl použit log-rank test. Obojí bylo opět provedeno ve statistickém prostředí R s využitím knihovny *survival* verze 2.38.

Hladina statistické významnosti (p) byla u všech testů stanovena na 0,05.

5. Výsledky

5.1. Výběr vhodných kandidátních genů

Nejdříve bylo nutné vybrat vhodné kandidátní geny, jejichž expresi bychom ve studii analyzovali. Vzhledem k velmi zajímavě se rozvíjejícímu poznání o významu angiogeneze u CLL jsme se rozhodli, že se budeme věnovat této oblasti. Práci týkající se exprese angiogenních faktorů maligními lymfocyty je totiž velmi málo a navíc se jedná o problematiku, které se pracoviště IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové dlouhodobě věnuje. Na základě literární rešerše byly vybrány angiopoetin-2, endoglin a fibroblastový růstový faktor 2.

5.2. Pilotní studie

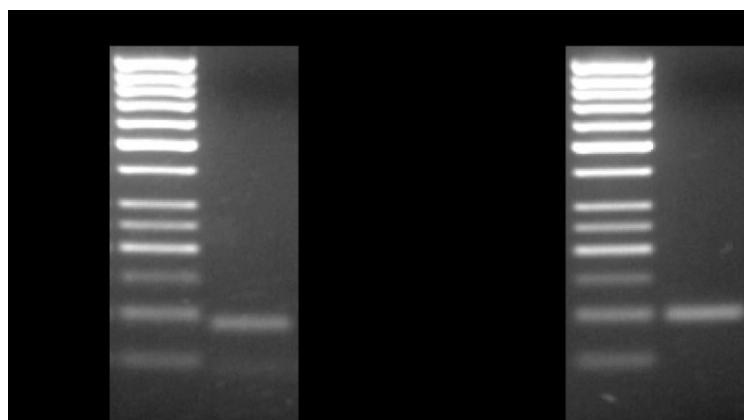
5.2.1. Příprava cDNA

První část projektu byla zaměřena na zvolení optimální metodiky izolace RNA ze vzorků nemocných s chronickou lymfocytární leukémií, která by byla používána v naší studii. Mononukleární buňky byly separovány z periferní krve 33 nemocných antikoagulované K₃EDTA pomocí gradientové centrifugace využívající Ficoll-Paque Plus. Mononukleární buňky opláchnuté v PBS byly spočítány na hematologickém analyzátoru Sysmex XE-2100 (Sysmex, Japonsko) a naředěny na koncentraci 10⁷ buněk/ml. Pro svou jednoduchost, standardizovanost a rozšířenost v molekulárně biologických laboratořích byla jako metoda první volby zvolena izolace pomocí křemičitých kolon High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Německo) z 200 µl buněčné suspenze dle doporučení výrobce. Eluční objem byl 100 µl. Eluovaná RNA byla okamžitě uložena do -80 °C, kde byla uchována do dalšího zpracování. Reverzní transkripce byla provedena pomocí soupravy Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo) dle doporučení výrobce s použitím oligo(dT)₁₈ primerů, které jsou součástí soupravy.

5.2.2. Příprava kvantifikačních reakcí

Pro účely této pilotní studie byl z angiogenních faktorů, jejichž exprese v maligních lymfocytech nemocných s CLL měla být stanovena, zvolen gen pro angiopoetin-2. Pro normalizaci byl zvolen u CLL často používaný udržovací gen Abl1. Pro navržení vhodných systémů pro kvantitativní analýzu pomocí PCR v reálném čase byla použita aplikace Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche, Německo) (Roche Life Science), která je založená na databázi 165 krátkých hydrolytických (tzv. TaqMan) sond obsahujících pro zvýšení specifity LNA modifikované nukleotidy. Samotná aplikace vyhledává optimální dvojice primerů, mezi kterými se vždy nachází sekvence komplementární alespoň jednou z těchto sond. Pro oba geny byla vybrána sestava, která byla *in silico* analýzou touto aplikací vybrána jako nejlepší. Obě sady primerů a sond byly následně pomocí programu VectorNTI (LifeTechnologies, USA) verze 10.0 prověřeny, zda neobsahují nevhodné komplementární sekvence, které by vedly k dimerizaci primerů či tvorbě vlásenkových struktur, což by mohlo snižovat účinnost PCR. Oba systémy byly v pořádku. Specifita obou detekčních směsí byla ověřena pomocí gelové elektroforézy

produktů kvantifikační PCR reakce. V obou případech reakce neobsahovaly žádný významný produkt, který by délkou neodpovídal navržené PCR reakci (viz. Obr. 3).



Obr. 3: Elektroforetická analýza specifity primerů PCR. M – škála; Abl1 - produkt kvantifikační PCR pro Abl-1 (84 bp); Ang-2 – produkt kvantifikační PCR pro Angiopoetin-2 (94 bp).

5.2.3. Příprava standardů pro pilotní studii

Pomocí aplikace Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche, Německo) (Roche Life Science) byly navrženy primery, jejichž cílové sekvence se nacházejí alespoň 100 bp vně oblasti rozpoznávané primery vybranými pro kvantifikační reakci využívající UPL sondy. Pomocí těchto primerů byla z cDNA náhodně vybraného pacienta provedena amplifikace z obou genů. Vzniklé produkty PCR o správné délce (Abl: 472 bp, Ang-2: 879 bp) byly rozděleny na gelové elektroforéze, vyříznuty z gelu a výsledná DNA byla izolována pomocí soupravy Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo) dle doporučení výrobce. Produkt PCR reakce byl vložen do vektoru pDrive (Qiagen, Německo) pomocí T-A klonovací techniky soupravou QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit (Qiagen, Německo) a amplifikován v bakterii *Escherichia coli* QIAGEN EZ Competent Cells (Qiagen, Německo). Tři kolonie pro každý gen byly přeneseny inokulační kličkou do tekutého LB média s ampicilinem a 16 hodin kultivovány. Následně byl ze všech 6 kultur izolován soupravou QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo) amplifikovaný plazmid. Kvantita a kvalita izolovaných plazmidů byla ověřena spektrofotometricky. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm se u všech vzorků pohyboval v rozmezí 1,9 – 2,0. Čistota DNA byla tedy dostatečná.

Jeden náhodně vybraný vzorek plazmidu pro Ang-2 a pro Abl-1 byl naředěn na koncentraci $1,00 \times 10^9$ molekul/ μl v TE pufru. Absolutní počet molekul byl vypočítán ze spektrofotometricky změřeného množství DNA ve vzorku a molekulární hmotnosti plazmidů (Tab. 8).

Tab. 8: Výpočet množství molekul v 1 μl elučního pufru

Standard	Koncentrace plazmidu	Délka plazmidu	Molekulární hmotnost	Počet molekul
Abl-1	184,5 ng/ μl	4260 bp	$2,81 \times 10^6$ g/mol	$3,95 \times 10^{10}/\mu\text{l}$
Angiopoetin-2	110 ng/ μl	4732 bp	$3,12 \times 10^6$ g/mol	$2,12 \times 10^{10}/\mu\text{l}$

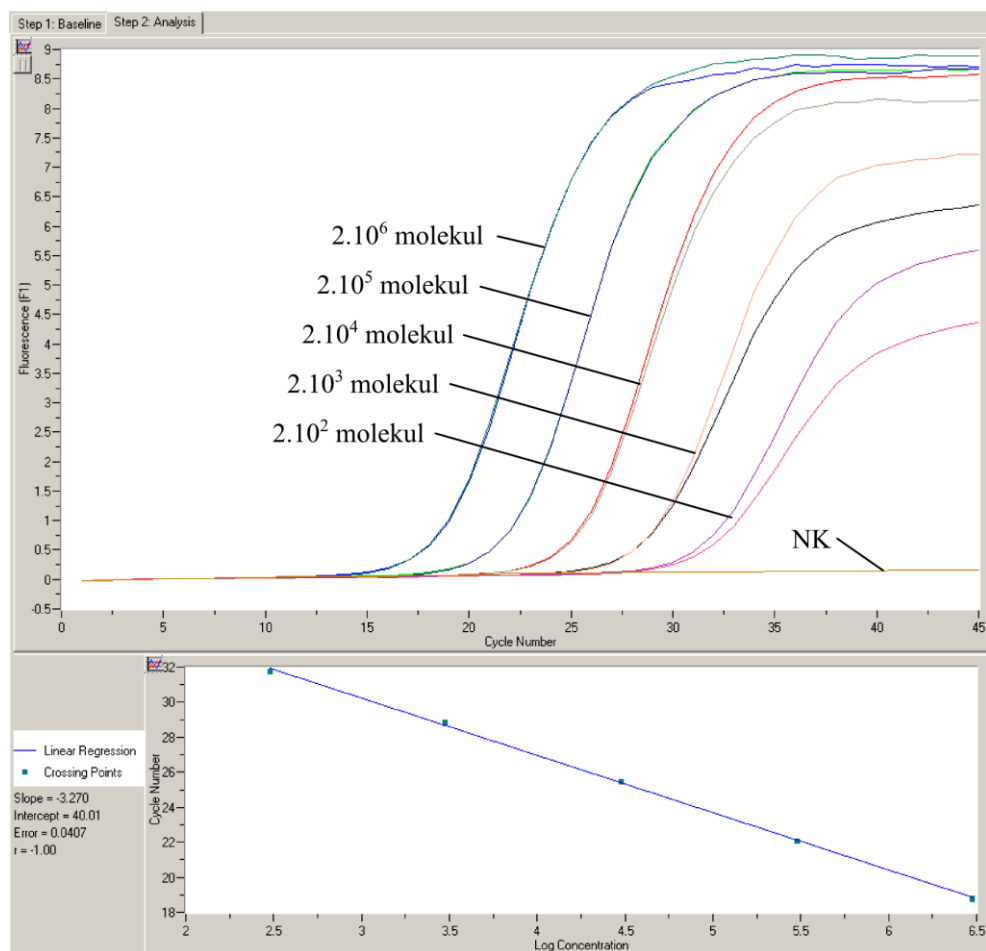
Plazmidy o požadované koncentraci $1,00 \times 10^9$ molekul/ μl byly rozděleny do aliquotů po 500 μl a zamraženy v -80°C do dalšího použití. Jeden aliquot od každého genu byl použit pro ověření sekvence standardu pomocí Sangerova sekvenování na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK k vyloučení přítomnosti možných mutací. Sekvenování bylo provedeno z obou stran inzertů pomocí primerů SP6 (CATTTAGGTGACACTATAG) a T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) komplementárních k sekvencím ve vektoru pDrive. Oba klony obsahovaly sekvence plně odpovídající referenčním sekvencím cDNA genů Abl1 (GenBank: NM_005157) a Ang-2 (GenBank: NM_001118887).

5.2.4. Kvantifikace transkripce pomocí PCR v reálném čase

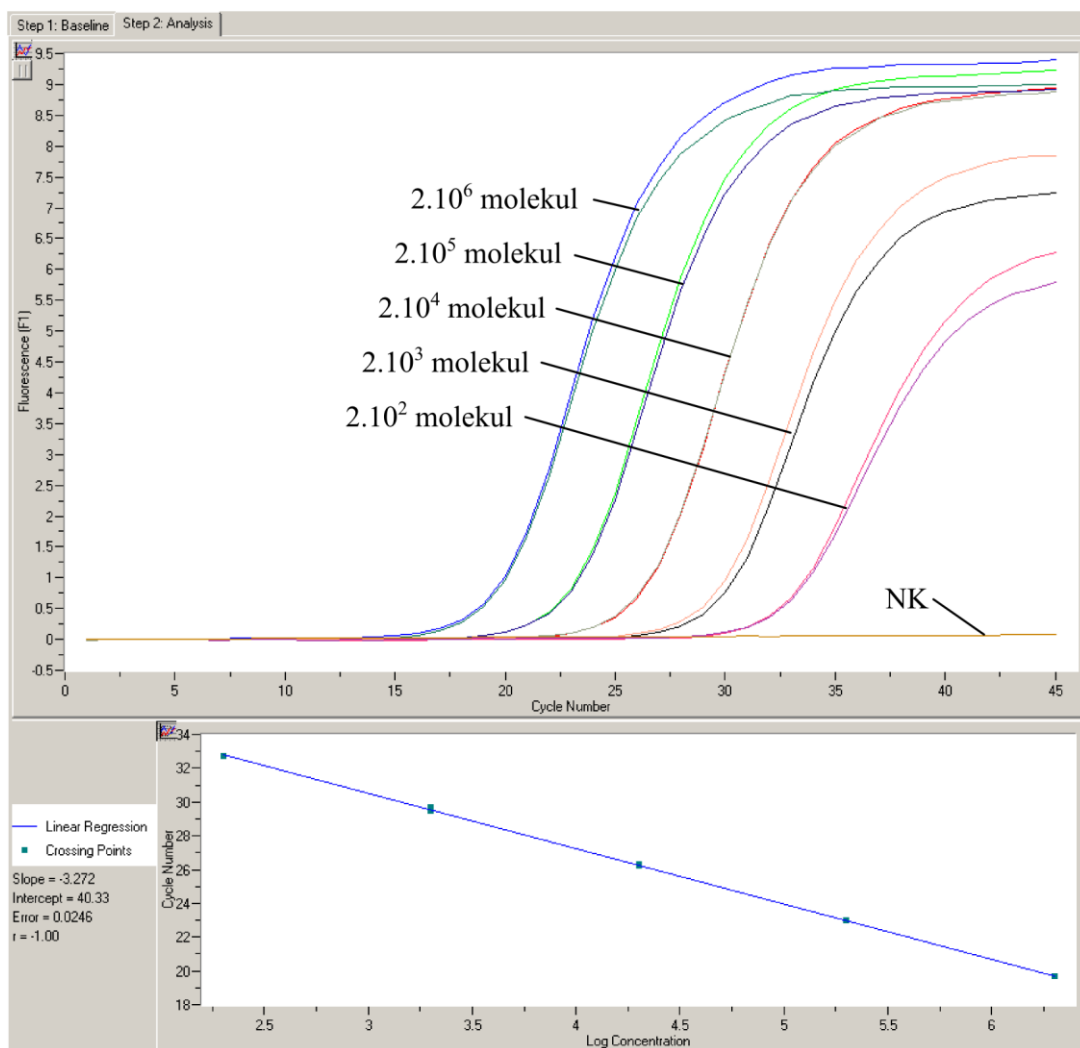
Před samotnou kvantifikací pomocí PCR v reálném čase byl pro každý sledovaný gen rozmražen jeden z aliquotů standardu o koncentraci 1×10^9 molekul/ μl . Po rozmražení byla z každého standardu připravena ředící řada kalibrátorů pro nadcházející kvantifikační reakci v rozsahu $1 \times 10^6 - 1 \times 10^2$ molekul/ μl .

Kvantifikační reakce byly prováděny vždy v dubletech dle protokolu, který je uveden v kapitole *Nemocní a metodiky*. Součástí každé reakce byla kontrola bez templátu, která místo vzorku cDNA obsahovala pouze vodu používanou pro přípravu reakční směsi. V těchto vzorcích nebyl ve všech případech naměřen jakýkoli signál a reakční směsi tedy neobsahovaly kontaminaci DNA, která by mohla interferovat s prováděnou analýzou.

Detekce bodů křížení byla provedena v software LightCycler Software 5.32 dodávaném k analyzátoru metodou „Second Derivative Maximum“. Absolutní kvantifikace počtu molekul byla provedena automaticky tímto software. Účinnost obou systémů byla vždy vyšší než 95 % při velmi dobré linearitě použitých měření kalibrátorů ($r > 0.99$) (viz. Obr. 4 a Obr. 5).



Obr. 4: Amplifikace kalibrátorů pro kvantifikaci cDNA genu pro Abl1 pomocí PCR v reálném čase. Nahoře: závislost fluorescence jednotlivých kalibrátorů o uvedeném počtu molekul a kontroly bez templátu – „NK“ na čísle cyklu. Dole: kalibrační přímka (závislost čísla cyklu na logaritmu původního počtu kopií u vzorků). Výsledná účinnost $E = 2,02$ (102 %).



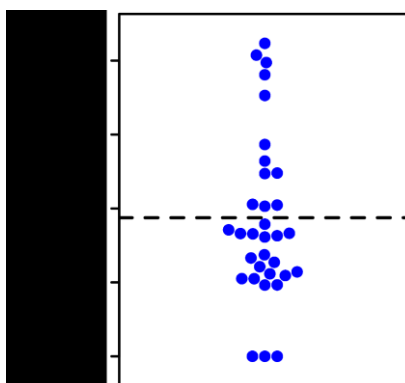
Obr. 5: Amplifikace kalibrátorů pro kvantifikaci cDNA genu pro angiopoetin-2 pomocí PCR v reálném čase. Nahoře: závislost fluorescence jednotlivých kalibrátorů o uvedeném počtu molekul a kontroly bez templátu – „NK“ na čísle cyklu. Dole: kalibrační přímka (závislost čísla cyklu na logaritmu původního počtu kopií u vzorků). Výsledná účinnost $E = 2,02$ (102 %).

Výsledky absolutní kvantifikace exprese genu pro Ang-2 byly normalizovány pro vyrovnání možných rozdílů v množství cDNA v jednotlivých vzorcích pomocí sjednocení na jednotkové množství exprese udržovacího genu Abl-1. Všechny prezentované výsledky jsou uvedeny jako poměr exprese těchto dvou genů.

5.2.5. Analýza výsledků pilotní studie

5.2.5.1. Nastavení hraniční hodnoty

Před samotnou statistickou analýzou bylo zapotřebí stanovit hraniční hodnotu odlišující vzorky s nízkou a vysokou mírou exprese Ang-2. Tato hodnota byla empiricky stanovena na $7,5 \times 10^{-3}$. Vzorky s nižší expresí dosahovaly velmi nízké míry exprese Ang-2 (Obr. 6). Při použití této hraniční hodnoty byla exprese genu pro Ang-2 vysoká u 12 a nízká u 21 nemocných.



Obr. 6: Distribuce exprese genu pro Ang-2 ve vzorcích nemocných s CLL. „ND“ - nedetekovatelné množství transkriptu, přerušovaná čára znázorňuje hraniční hodnotu $7,5 \times 10^{-3}$. Expres byla vysoká u 12 a nízká u 21 nemocných.

5.2.5.2. Statistická analýza výsledků

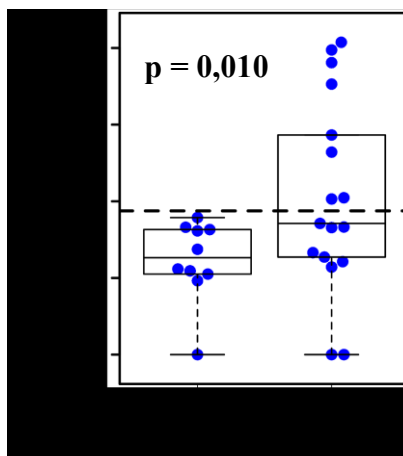
Pomocí analýzy testem χ^2 byla následně statisticky zhodnocena případná závislost mezi expresí genu pro Ang-2 a vybranými prognostickými ukazateli (mutačním stavem IGHV, expresí CD38 a ZAP-70), klinickým stádiem dle Raie a stavem onemocnění v době odběru. Zároveň byla provedena analýza doby od odběru do progresu onemocnění. Pro další analýzy, jako je např. analýza celkového přežití, byla doba sledování příliš krátká.

Vztah s mutačním stavem IGHV

Vztah exprese Ang-2 a mutačního stavu IGHV byl analyzován u 28 nemocných, neboť ostatní nemocní neměli mutační stav stanovený. Jeden případ s mutovaným IGHV byl z analýzy vyloučen, neboť maligní klon využíval přestavbu VH3-21, která znamená nepříznivou prognózu i při mutovaném stavu IGHV. Je ale zajímavé, že míra exprese Ang-2 u tohoto nemocného byla velmi vysoká (1,71) a byla tudíž ve shodě se špatnou prognózou onemocnění. V naší studii byl prokázán vztah mezi mutovaným IGHV a nízkou mírou exprese Ang-2 ($n = 27$; $p = 0,010$) (viz. Tab. 9 a Obr. 7).

Tab. 9: Vztah exprese Ang-2 a mutačního stavu IGHV

$p = 0,010$	Nízká exprese Ang-2	Vysoká exprese Ang-2	Celkem
IGHV nemutované	9	8	17
IGHV mutované	10	0	10
Celkem	19	8	27



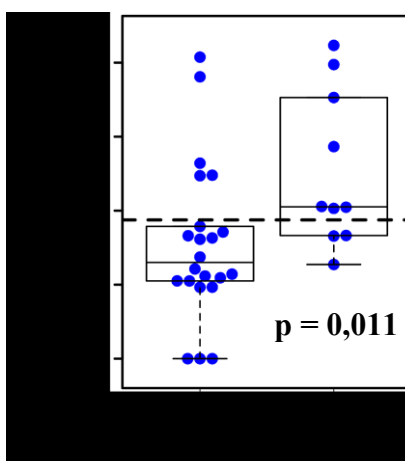
Obr. 7: Distribuce exprese genu pro Ang-2 podle mutačního stavu IGHV. „ND“ - nedetekovatelné množství transkriptu, „Mut.“ - mutovaný IGHV, „Nemut.“ - nemutovaný IGHV, přerušovaná čára znázorňuje hraniční hodnotu exprese Ang-2 $7,5 \times 10^{-3}$.

Vztah s expresí CD38

Vztah exprese Ang-2 a CD38 byl analyzován u 32 nemocných. U jednoho nemocného nebyla míra exprese CD38 stanovena. Nemocní s vysokou expresí CD38 mají statisticky významně vyšší expresi Ang-2 ($n = 32$, $p = 0,011$) (viz. Tab. 10 a Obr. 8).

Tab. 10: Vztah exprese Ang-2 a exprese CD38

$p = 0,011$	Nízká exprese Ang-2	Vysoká exprese Ang-2	Celkem
Vysoká exprese CD38	3	7	10
Nízká exprese CD38	17	5	22
Celkem	20	12	32



Obr. 8: Distribuce exprese genu pro Ang-2 podle míry exprese CD38.
„ND“ - nedetekovatelné množství transkriptu, přerušovaná čára znázorňuje hraniční hodnotu exprese Ang-2 $7,5 \times 10^{-3}$.

Vztah s expresí ZAP-70, klinickým stádiem a průběhem onemocnění

Studie neprokázala statisticky významnou závislost mezi expresí Ang-2 a expresí ZAP-70 ($n = 32$, $p = 0,784$) (Tab. 11), klinickým stádiem dle Raie ($n = 33$, $p = 0,305$) (Tab. 12) a stavem onemocnění v době odběru ($n = 33$, $p = 0,443$) (Tab. 13).

Tab. 11: Vztah exprese Ang-2 a exprese ZAP-70

p = 0,784	Nízká exprese Ang-2	Vysoká exprese Ang-2	Celkem
Vysoká exprese ZAP-70	9	6	15
Nízká exprese ZAP-70	11	6	17
Celkem	20	12	32

Tab. 12: Vztah exprese Ang-2 a klinického stadia dle Raie

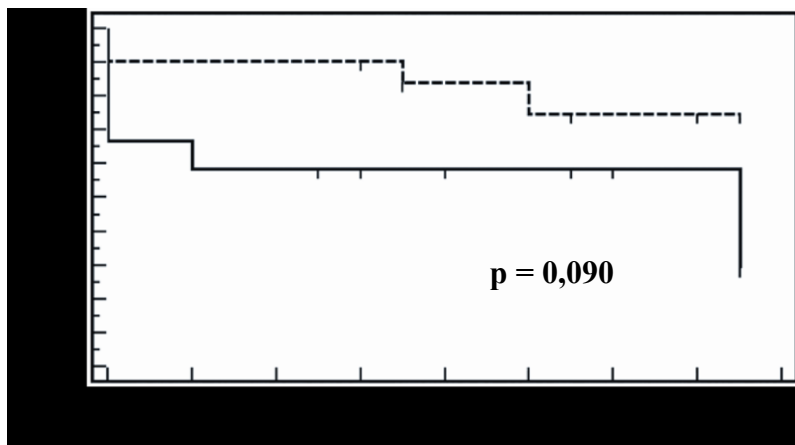
p = 0,305	Nízká exprese Ang-2	Vysoká exprese Ang-2	Celkem
Stádium dle Raie 0	9	3	12
Stádium dle Raie I-III	12	9	21
Celkem	21	12	33

Tab. 13: Vztah exprese Ang-2 a klinického průběhu onemocnění

p = 0,443	Nízká exprese Ang-2	Vysoká exprese Ang-2	Celkem
Progredující CLL	6	5	11
Stabilní CLL	15	7	22
Celkem	21	12	33

Vztah s obdobím do léčby 1. linie

Období do léčby 1. linie bylo u nemocných s vysokou expresí Ang-2 kratší. Rozdíl však nebyl statisticky významný ($n = 33$, $p = 0,090$) (Obr. 9).



Obr. 9: Analýza doby do progresu. Přerušovaná čára – pacienti s nízkou expresí Ang-2, plná čára – pacienti s vysokou expresí Ang-2.

5.2.6. Závěry pilotní studie

Ačkoli studie prokázala, že použitá metoda umožňuje kvalitní kvantifikaci genové exprese genu Ang-2, ukázala i zásadní slabinu použitého přístupu. Expresí Ang-2 v maligních lymfocytech je v řadě případů velmi nízká a metoda založená na křemičitých kolonách neumožňuje izolaci RNA o dostatečně vysoké koncentraci, aby bylo možné tyto nízké koncentrace kvalitně odlišit. Je tedy nezbytné použít jinou metodu izolace RNA umožňující vyšší koncentraci celkové (a tedy i studované) RNA.

5.3. Hlavní studie

5.3.1. Příprava cDNA

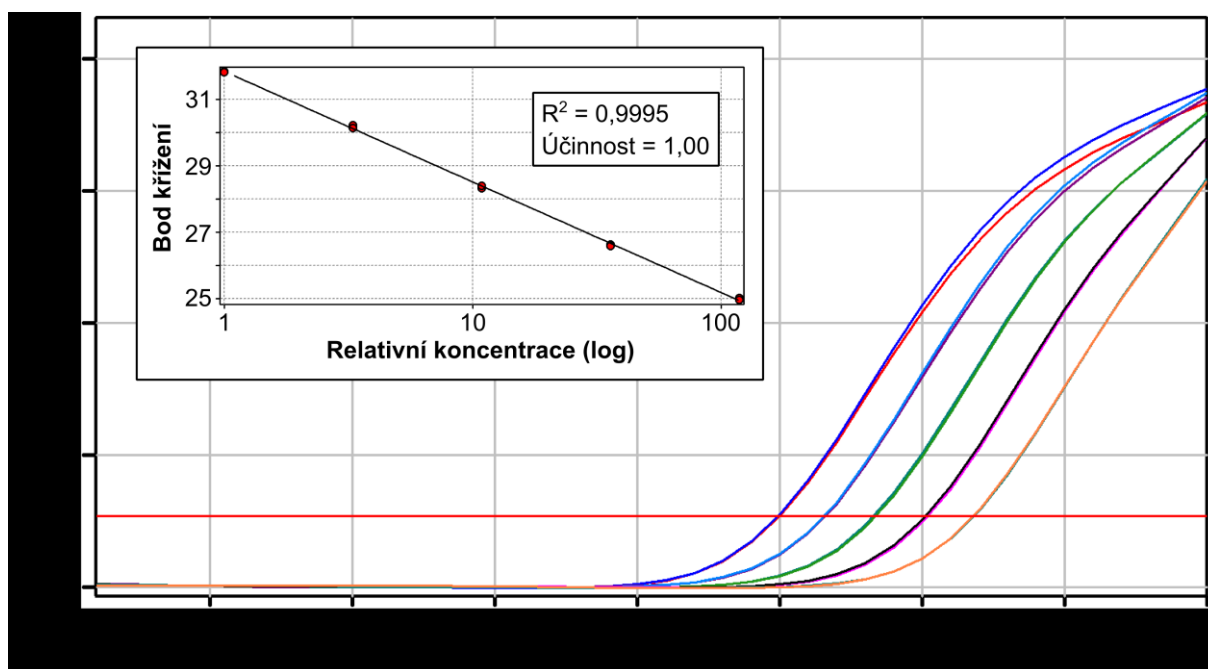
Vzhledem k rozvoji metod separace buněk CLL jsme se rozhodli v navazující studii použít specifitější způsob založený na negativní selekci CD19 pozitivních lymfocytů pomocí RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, USA). Tento typ separace umožnil analýzu maligních lymfocytů s vysokou čistotou, která dosahovala více než 95 % všech elementů ve výsledné suspenzi, což bylo ověřeno pomocí průtokové cytometrie na Ústavu Klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové na přístroji Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, USA) s využitím protilátek anti-CD19 a anti-CD5 (Beckman Coulter, USA).

Pro izolaci RNA jsme zvolili metodu založenou na TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), který umožňuje vytvoření lyzátů z vyššího počtu buněk při možném rozpuštění výsledné RNA do menšího objemu. Tento typ izolace RNA tak odstranil hlavní nedostatek, který se ukázal v průběhu pilotní studie. 35×10^6 buněk připravených podle postupu uvedeného v kapitole *Nemocní a metodiky* bylo lyzováno do 1 ml. Následná izolace RNA byla provedena do celkového elučního objemu 20 μ l. Pět mikrolitrů této RNA bylo ihned přepsáno do cDNA pomocí SuperScript III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen, USA). Zbylá RNA byla okamžitě uložena do -80°C . cDNA byla uložena v -20°C do analýzy.

5.3.2. Příprava kvantifikačních reakcí

V průběhu pilotní studie bylo pracoviště vybaveno novým, modernějším, cyklerem pro PCR v reálném čase RotorGene 6000 (Qiagen, Německo), který umožňuje provádět více paralelních reakcí v jednom běhu (72 místo 32). Změny byly provedeny i v analytickém postupu. Místo Universal ProbeLibrary (Roche, Německo) byl pro všechny geny použit na našem pracovišti nově využívaný systém expresních esejí firmy Life Technologies (Life technologies, USA). Po ověření účinnosti kvantifikačních reakcí, která ve všech případech dosahovala hodnot vyšších než 95 % (ukázka ověření účinnosti genu HPRT1 viz Obr. 10), byla za vhodnou metodu relativní kvantifikace zvolena metoda $\Delta\Delta\text{Ct}$. Tato metoda nevyžaduje provádění kalibrace v každém běhu a umožňuje tak analýzu vyššího počtu vzorků, popř. využití tripletů místo dubletů použitých v pilotní studii. Vzhledem k prokázané

variabilní expresi genu *Abl1* v maligních lymfocytech CLL (Lin et al. 2006), byl jako nový udržovací gen zvolen *HPRT1*, který je v naší laboratoři standardně využíván.



Obr. 10: Ověření účinnosti kvantifikační reakce genu *HPRT1*. Ověření bylo provedeno pomocí ředící řady cDNA náhodně vybraného vzorku. Horizontální červená čára vyznačuje míru fluorescence použitou pro stanovení bodu křížení. Výsledná účinnost = 1,00 (100 %).

5.3.3. Kvantifikace pomocí PCR v reálném čase

Kvantifikace pomocí PCR v reálném čase byla provedena reakční směsí TaqMan Gene Expression Master Mix a komerčně dostupnými systémy pro detekci množství cDNA firmy Life Technologies (viz kapitola *Nemocní a metodiky*). Součástí každé skupiny reakcí byl i kalibrátor umožňující kompenzaci variability mezi jednotlivými běhy v metodě $\Delta\Delta C_t$. Jako kalibrátor byl pro každý gen vybrán náhodně vybraný vzorek s dostatečnou mírou exprese. Hodnota fluorescence pro odečtení bodů křížení (C_t) jednotlivých vzorků byla vybrána ručně v obslužném software cyklu RotorGene 6000. Analýza $\Delta\Delta C_t$ byla provedena v software Microsoft Excel 2010.

5.3.4. Analýza výsledků hlavní studie

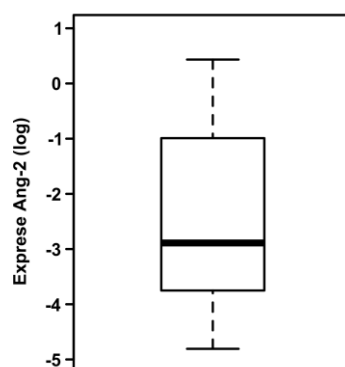
V hlavní studii byla analyzována exprese genů pro Ang-2, CD105 a FGF-2 maligními lymfocyty izolovanými z periferní krve 97 nemocných s CLL. Rozdílná exprese jednotlivých

genů u nemocných rozdělených podle mutačního stavu IGHV, exprese CD38 a ZAP70, klinického stádia dle Raie a průběhu onemocnění v době odběru byla statisticky analyzována pomocí Mann-Whitneyova U testu. Přehled rozdělení nemocných na základě hodnocených prognostických znaků je uveden v tabulce 7 v kapitole *Nemocní a metodiky*. Pro potřeby analýzy pomocí metody Kaplan-Meier a log-rank test byli nemocní vždy rozděleni do dvou skupin podle míry exprese analyzovaného genu (exprese vyšší než medián byla brána jako vysoká).

Vzhledem ke známé regulaci genové exprese FGF-2 pomocí anti-sense genu NUDT6, jsme zařadili do studie i analýzu exprese této regulační molekuly, abychom ověřili možnost regulace množství transkriptu FGF-2 pomocí NUDT6 (MacFarlane and Murphy 2010).

5.3.4.1. Analýza exprese genu pro angiopoetin-2

mRNA angiopoetinu-2 je v maligních lymfocytech CLL exprimována s velkou variabilitou mezi jednotlivými nemocnými. Přesný rozsah nebylo možné stanovit, neboť fluorescence některých vzorků nedosáhla hranice pro stanovení bodu křížení a exprese tedy byla nižší, než citlivost použité metody. I při použití dolní hranice citlivosti jako minimální koncentrace však překročila 5 řádů (Obr. 11).



Obr. 11: Distribuce relativní exprese Ang-2 v analyzovaném souboru. Data byla transformována pomocí dekadického logaritmu.

Vztah exprese Ang-2 s prognostickými znaky

Vztah exprese angiopoetinu-2 a mutačního stavu IGHV byl analyzován u 80 nemocných. Nemocní s nemutovaným IGHV, tedy nepříznivou prognózou, měli statisticky významně vyšší expresi Ang-2 ($n = 80$, $p = 0,0023$) (viz. Obr.12A).

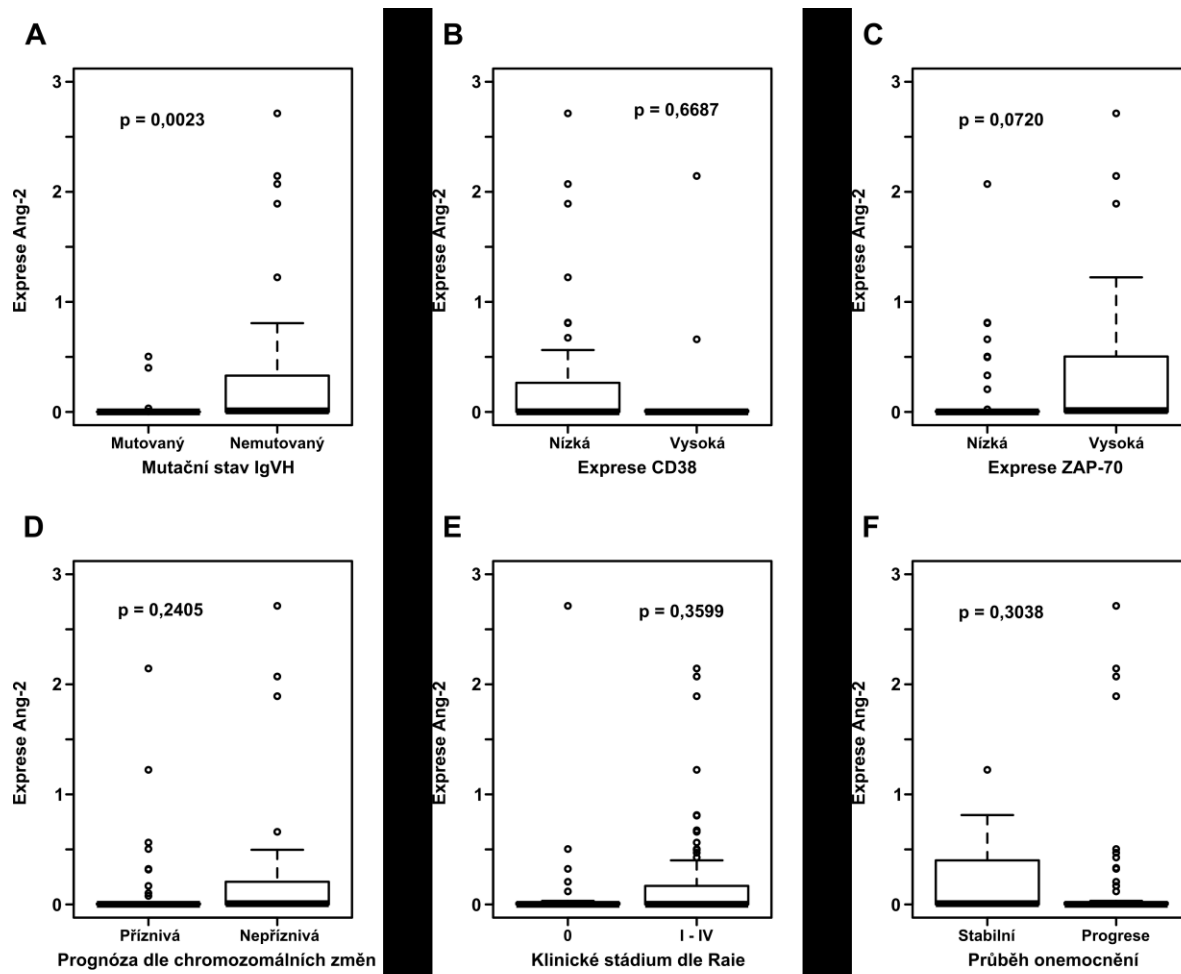
Vztah exprese Ang-2 a CD38 byl analyzován u 70 nemocných. V souboru nemocných analyzovaných v naší studii nebyl statisticky významný rozdíl v expresi Ang-2 mezi nemocnými s nízkou, resp. vysokou expresí CD38 ($n = 70$, $p = 0,6687$) (Obr. 12B).

Vztah exprese Ang-2 a proteinu ZAP-70 byl analyzován také u 70 nemocných. V analyzovaném souboru nebyl statisticky významný rozdíl v expresi Ang-2 u nemocných rozdělených podle exprese ZAP-70 ($n = 70$, $p = 0,0720$) (Obr. 12C).

Expres Ang-2 se statisticky významně nelišila ani u nemocných s rozdílnou prognózou stanovenou na základě cytogenetické analýzy často se vyskytujících chromozomových změn ($n = 72$, $p = 0,2405$) (Obr. 12D). Negativní nález a přítomnost samotné delece 13q byly hodnoceny jako prognosticky příznivé; nález delece 11q, trizomie 12. chromozómu, delece 17p a komplexního karyotypu byly hodnoceny jako prognosticky nepříznivé.

Expres genu pro Ang-2 nebyla statisticky významně odlišná ani u nemocných rozdělených na základě rizika onemocnění podle stádia dle Raie v době odběru (nízké proti střední a vysoké) ($n = 97$, $p = 0,3599$) (Obr. 12E).

Ani v expresi Ang-2 mezi nemocnými rozdělenými na základě klinického průběhu onemocnění v době odběru nebyl statisticky významný rozdíl (stabilní nebo progredující onemocnění) ($n = 97$, $p = 0,3038$) (Obr. 12F). Expres Ang-2 tedy není významně ovlivněna aktuálním klinickým průběhem onemocnění.

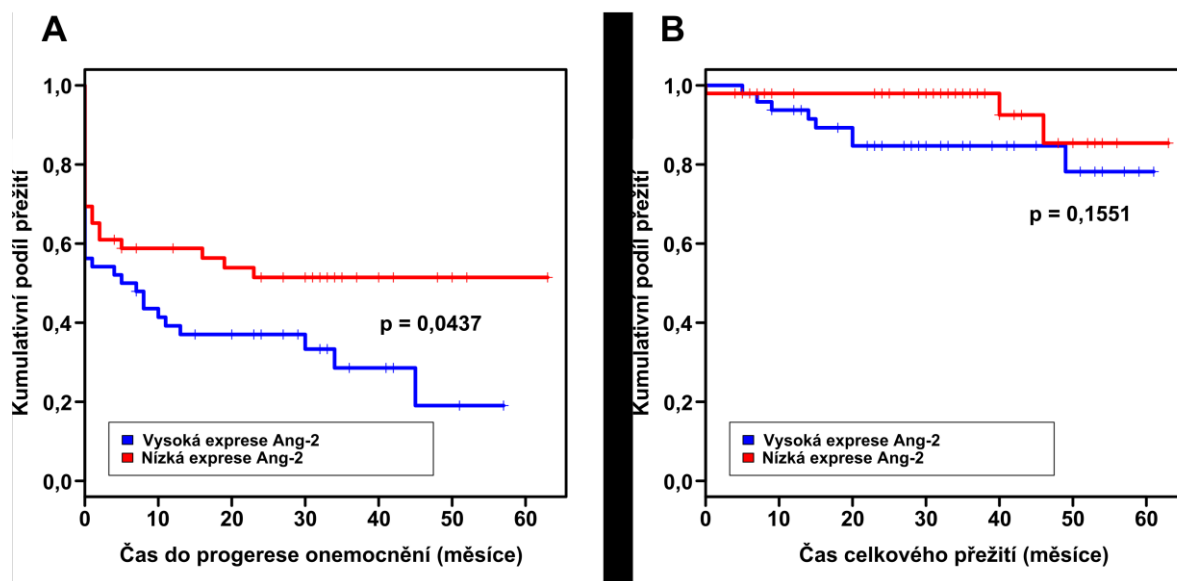


Obr. 12: Analýza vztahu exprese genu pro angiopoetin-2 s používanými prognostickými znaky. Expres genu pro Ang-2 byla porovnána u skupin rozdělených podle prognózy onemocnění na základě dnes používaných klasických i moderních prognostických znaků – mutačního stavu IGHV (**A**), exprese CD38 (**B**) a ZAP-70 (**C**), chromozomálních změn (**D**), klinického stádia dle Raie (**E**) a průběhu onemocnění v době odběru (**F**).

Analýza období do léčby 1. linie a celkového přežití nemocných

Období do léčby 1. linie bylo u nemocných s vysokou expresí Ang-2 statisticky významně kratší ($n = 97$, $p = 0,0437$) (Obr. 13A) s mediánem u nemocných s vysokou expresí Ang-2 6 měsíců; u nemocných s nízkou expresí Ang-2 nebylo mediánu dosaženo. Výsledek je však ovlivněn velkým počtem nemocných, kteří byli do studie zařazeni v čase počínající progrese.

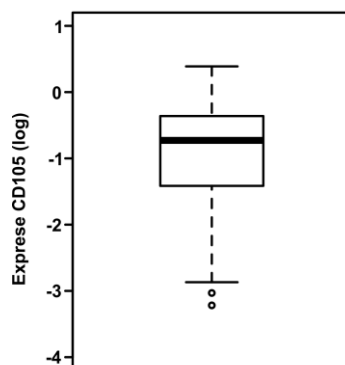
Doba celkového přežití se u nemocných s vysokou a nízkou expresí Ang-2 statisticky významně nelišila ($n = 97$, $p = 0,1551$) (Obr. 13B).



Obr. 13: Analýza doby do progrese (A) a celkového přežití (B) u nemocných rozdělených podle exprese Ang-2.

5.3.4.2. Analýza genu pro endoglin

Relativní exprese genu pro endoglin v maligních lymfocytech nemocných s CLL v naší studii byla méně variabilní než v případě Ang-2. Variabilita však byla opět poměrně vysoká (3,6 řádu) (Obr. 14).



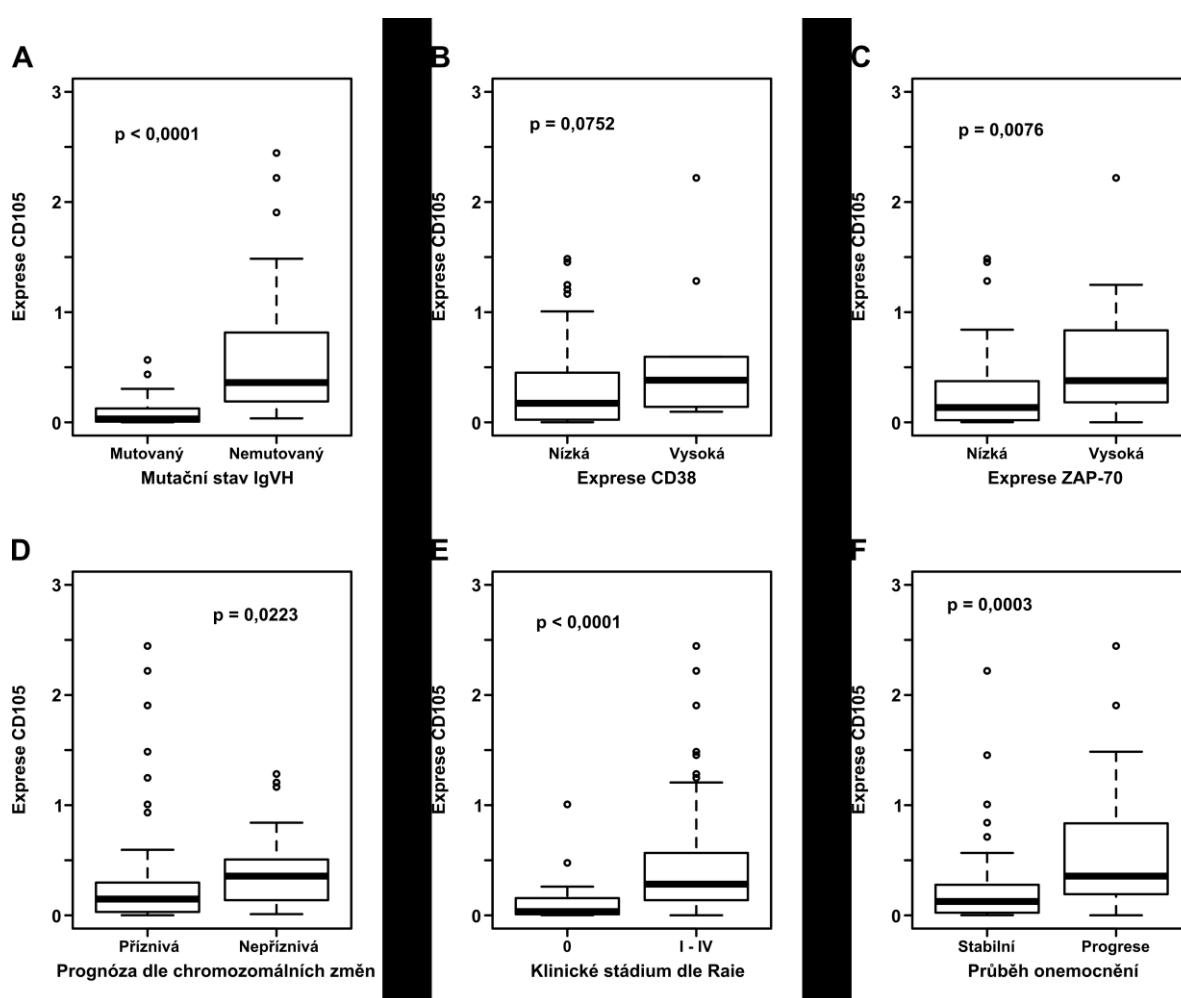
Obr. 14: Distribuce relativní exprese endoglinu v analyzovaném souboru. Data byla transformována pomocí dekadického logaritmu.

Vztah exprese endoglinu s prognostickými znaky

Analýza exprese mRNA endoglinu prokázala statisticky významný rozdíl u nemocných rozdělených podle mutačního stavu IGHV ($n = 80$, $p < 0,0001$). Expres byla vyšší u nemocných s nemutovaným IGHV, tedy horší prognózou (viz. Obr.15A).

Expresí genu pro endoglin u nemocných rozdělených do skupin podle exprese molekuly CD38 se statisticky významně nelišila ($n = 70$, $p = 0,0752$) (Obr. 15B). U nemocných s vysokou expresí proteinu ZAP-70 byla exprese Ang-2 statisticky významně vyšší ($n = 70$, $p = 0,0076$) (Obr. 15C).

Expresí CD105 byla statisticky významně vyšší i u nemocných s nepříznivým karyotypem ($n = 72$, $p = 0,0223$) (Obr. 15D), nemocných se středním a vysokým rizikem onemocnění podle stádia dle Raie (nízké proti střední a vysoké) ($n = 97$, $p < 0,0001$) (Obr. 15E) a nemocných, u kterých byl odběr proveden v progresi onemocnění ($n = 97$, $p = 0,0003$) (Obr. 15F).

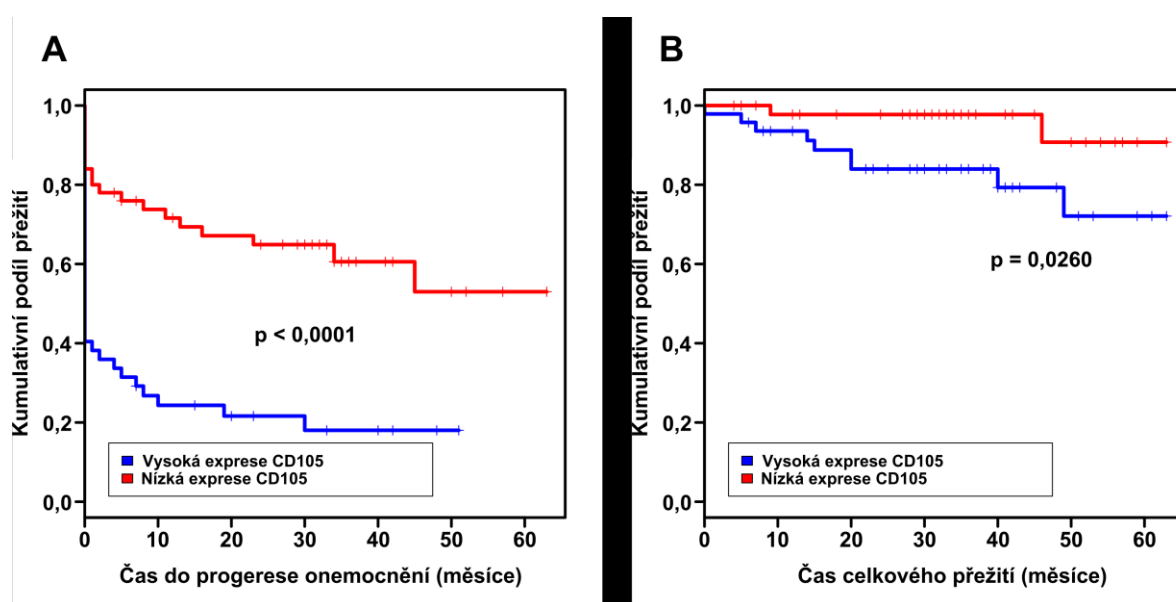


Obr. 15: Analýza vztahu exprese genu pro endoglin s používanými prognostickými znaky. Expresí genu pro endoglin byla porovnána u skupin rozdělených podle prognózy onemocnění na základě dnes používaných klasických i moderních prognostických znaků – mutačního stavu IGHV (A), exprese CD38 (B) a ZAP-70 (C), chromozomálních změn (D), klinického stádia dle Raie (E) a průběhu onemocnění v době odběru (F).

Analýza období do léčby 1. linie a celkového přežití nemocných

Období do léčby 1. linie bylo u nemocných s vysokou expresí endoglinu statisticky významně kratší ($n = 97$, $p < 0,0001$) (Obr. 16A). Medián času do progresu u nemocných s vysokou expresí endoglinu byl 0 měsíců; u nemocných s nízkou expresí nebylo mediánu dosaženo. Výsledek je však opět ovlivněn velkým počtem nemocných, kteří byli do studie přijati v čase počínající progresu.

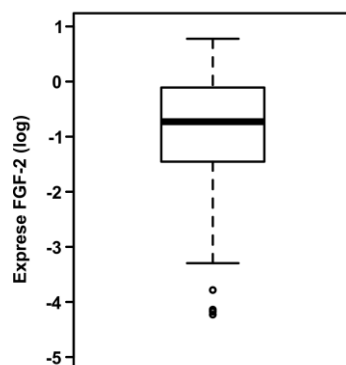
U nemocných s vysokou expresí endoglinu byla statisticky významně kratší i doba celkového přežití ($n = 97$, $p = 0,0260$) (Obr. 16B). U obou skupin nebylo dosaženo mediánu přežití (Tab. 15).



Obr. 16: Analýza doby do progresu (A) a celkového přežití (B) u nemocných rozdělených podle exprese endoglinu.

5.3.4.3. Analýza genu pro fibroblastový růstový faktor 2

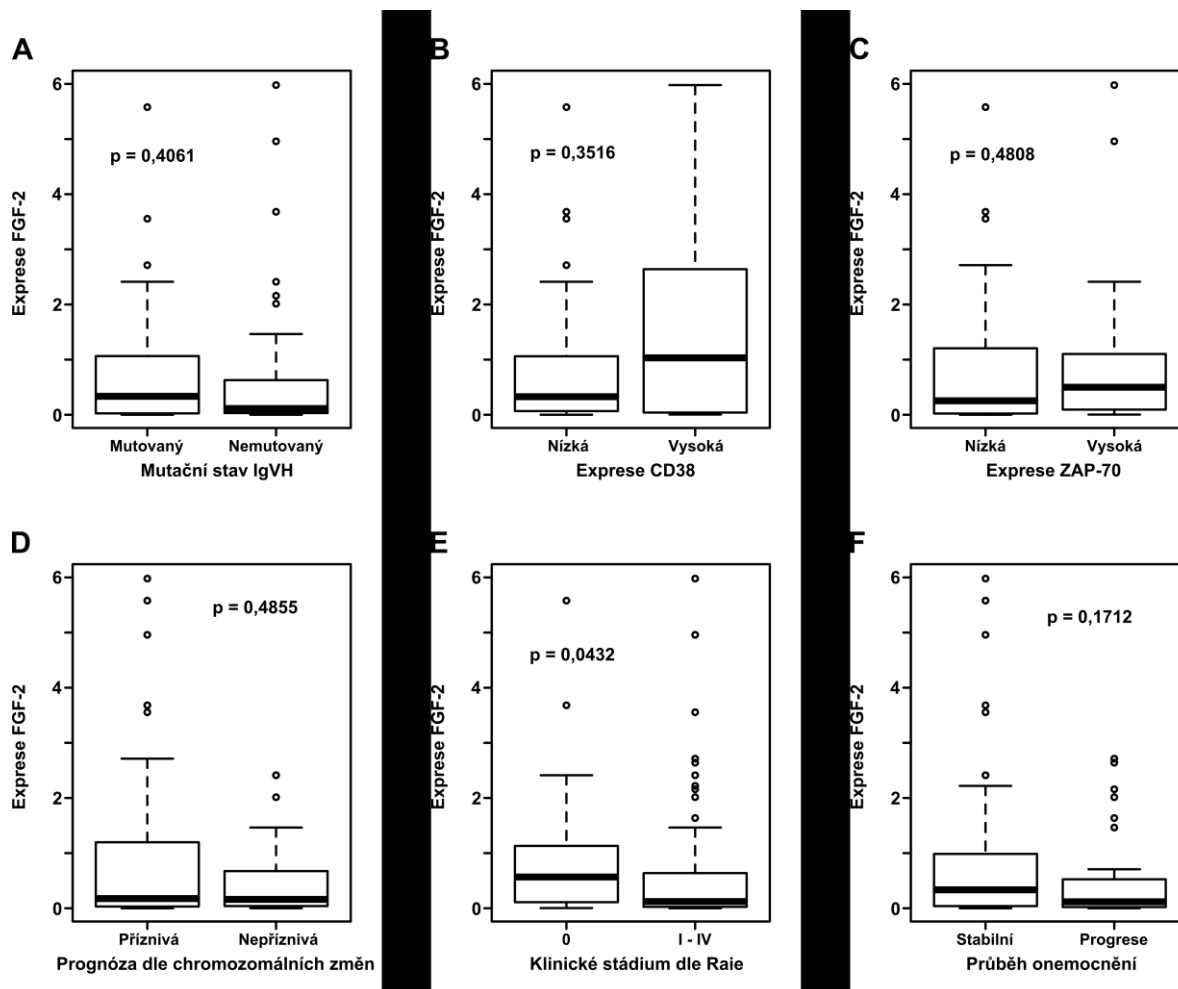
Relativní exprese FGF-2 v maligních lymfocytech byla také velmi variabilní. Rozsah exprese v analyzovaném souboru byl 5 řádů (Obr. 17).



Obr. 17: Distribuce relativní exprese FGF-2 v analyzovaném souboru. Data byla transformována pomocí dekadického logaritmu.

Vztah exprese FGF-2 s prognostickými znaky

Expres genu pro FGF-2 se u nemocných rozdělených podle mutačního stavu IGHV statisticky významně nelišila ($n = 80$, $p = 0,4061$) (Obr.18A). Statisticky významný rozdíl nebyl ani u nemocných rozdělených podle exprese CD38 ($n = 70$, $p = 0,3516$) (Obr. 18B) a ZAP-70 ($n = 70$, $p = 0,4808$) (Obr. 18C), prognózy stanovené na základě cytogenetického vyšetření ($n = 72$, $p = 0,4855$) (Obr. 18D) a klinického průběhu onemocnění v době odběru ($n = 97$, $p = 0,1712$) (Obr. 18F). Statisticky významný rozdíl byl pouze u nemocných rozdělených do skupin na základě rizika onemocnění podle stádia dle Raie ($n = 97$, $p = 0,0432$) (Obr. 18E).

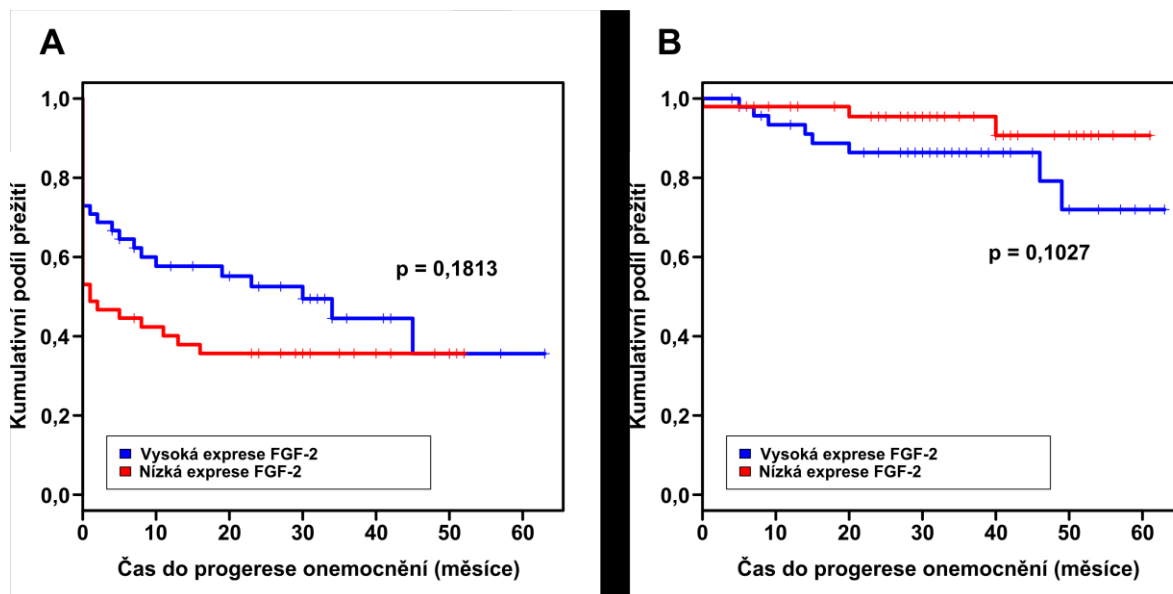


Obr. 18: Analýza vztahu exprese genu pro FGF-2 s používanými prognostickými znaky. Expresce genu pro FGF-2 byla porovnána u skupin rozdělených podle prognózy onemocnění na základě dnes používaných klasických i moderních prognostických znaků – mutačního stavu IGHV (A), exprese CD38 (B) a ZAP-70 (C), chromozomálních změn (D), klinického stádia dle Raie (E) a průběhu onemocnění v době odběru (F).

Analýza období do léčby 1. linie a celkového přežití nemocných

Medián období do léčby 1. linie se u nemocných rozdělených do skupin podle exprese FGF-2 významně nelišil ($n = 97$, $p = 0,1813$) (Obr. 19A). Výsledek je opět ovlivněn velkým počtem nemocných, kteří byli do studie přijati v čase počínající progrese onemocnění.

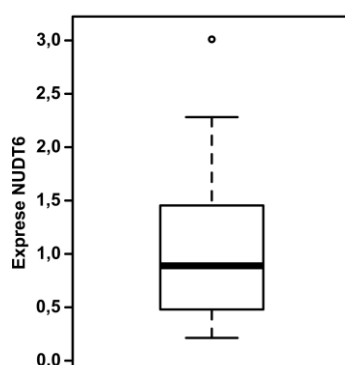
Celkové přežití mezi skupinami rozdělenými podle exprese FGF-2 se také statisticky významně nelišilo ($n = 97$, $p = 0,1027$) (Obr. 19B). I v tomto případě nebylo u obou skupin dosaženo mediánu.



Obr. 19: Analýza doby do progresu (A) a celkového přežití (B) u nemocných rozdělených podle exprese FGF-2.

Analýza exprese regulačního genu NUDT6

Expres genu FGF-2 je post-transkripčně regulovaná pomocí transkriptu genu NUDT6, který se nachází na komplementárním vlákně DNA a s genem pro FGF-2 se částečně překrývá (MacFarlane and Murphy 2010). Pro ověření možnosti regulace exprese FGF-2 v maligních lymfocytech nemocných s CLL prostřednictvím variabilní exprese genu NUDT6 bylo provedeno měření exprese i tohoto genu. Gen NUDT6 je však v těchto buňkách exprimován velmi stabilně a rozdíl exprese u nejméně a nejvíce exprimujícího vzorku byl pouze 1,4 řádu (po vyloučení jediné odlehle hodnoty pouze 1,1 řádu). Interkvartilově byla exprese rozdílná pouze trojnásobně (Obr. 20).



Obr. 20: Relativní exprese genu NUDT6 v lymfocytech nemocných s CLL.

6. Diskuze

CLL je onemocnění s velmi variabilním průběhem. Zatímco délka života části nemocných se neliší od jedinců zdravé populace, část nemocných na toto onemocnění umírá již během dvou let od stanovení diagnózy. Je proto velmi důležité co nejdříve stanovit prognózu onemocnění a přizpůsobit podle ní přístup k jednotlivým nemocným. Klasické prognostické ukazatele, mezi které patří např. stanovení klinického stádia či aktuální průběh onemocnění, rozlišují nemocné spíše podle stávajícího rozsahu CLL a jejich význam je tak velmi omezený. Zejména v posledních letech, kdy je většina nemocných diagnostikována v časných stádiích a k rozvoji nemoci ještě nedošlo. Některé další prognostické ukazatele, jako např. cytogenetické vyšetření, mohou určit prognózu nemocných přesněji, jejich využití je však možné pouze v omezeném množství případů a jejich prognostický význam je v řadě případů nejistý. Z molekulárně genetických vyšetření se využívá převážně stanovení mutací v genu TP53 a mutační stav IGHV. Analýza mutačního stavu IGHV však není nezbytná, neboť podle aktuálních doporučení nemění způsob léčby. Stanovení prognózy podle výše jmenovaných ukazatelů má však navíc stále řadu výjimek a je tedy žádoucí hledat nové znaky, které by umožnily zpřesnit stanovení prognózy CLL.

Vzhledem k narůstajícímu počtu publikací prokazujících roli angiogeneze u hematologických malignit jsme se zaměřili na tuto oblast, která nebyla u CLL prozkoumána v takovém rozsahu, jako u jiných maligních onemocnění (Folkman 1971; Perez-Atayde, et al. 1997). Na základě literárních údajů a vlastních výsledků s variabilní expresí v séru/plazmě nemocných s CLL jsme zvolili geny pro angiopoetin-2, endoglin a fibroblastový růstový faktor 2.

Nejprve bylo zapotřebí zvolit vhodnou metodu izolace RNA pro přípravu materiálu pro analýzu genové exprese pomocí PCR v reálném čase. V pilotní studii jsme analyzovali soubor 33 nemocných s mediánem věku 63 let, což je výrazně méně, než udává literatura (přibližně 70 let v době diagnózy). Nižší věk je způsoben tím, že IV. interní hematologická klinika je hematologickým centrem pro Královéhradecký a Pardubický kraj České republiky a naše pracoviště poskytuje konziliární vyšetření a převzetí léčby pro nemocné s nepříznivým průběhem onemocnění. Z regionálních pracovišť jsou proto odesíláni především mladší nemocní, u nichž je více možností léčebného ovlivnění CLL. Starší nemocní jsou více léčeni paliativně na spádových pracovištích. V tomto souboru nemocných byla RNA izolována pomocí velmi snadné a rozšířené metody založené na nepřímé vazbě (prostřednictvím kladně nabitých iontů) nukleových kyselin na záporně nabitě křemičité povrchy. Analýza exprese

genu pro angiopoetin-2, který byl zvolen jako první gen analyzovaný v této pilotní studii, ukázala, že řada vzorků byla na hranici detekovatelnosti transkriptů pomocí PCR v reálném čase a bude tedy zapotřebí zvolit metodu izolující RNA ve vyšší koncentraci.

V následujících experimentech jsme proto použili izolaci založenou na TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), která umožňuje izolovat RNA z většího množství buněk do velmi malého objemu vody nebo pufru. Zároveň byla použita vhodnější metoda separace CD19 pozitivních buněk. V této navazující studii bylo vyšetřeno 97 nemocných s mediánem věku také 63 let (36-84). Nižší věk skupiny lze vysvětlit stejnými důvody jako v případě pilotní studie.

Angiopoetin-2 hraje v angiogenezi zásadní roli. V případě zahájení angiogenních procesů dojde k jeho navázání na receptor Tie-2, čímž se buňky endotelu stanou citlivější k dalším angiogenním faktorům (Maffei, et al. 2010a). Ve spolupráci s VEGF způsobuje Ang-2 destabilizaci stěn stávajících cév a umožňuje jejich další přestavbu (Folkman 2002). Zvýšená exprese Ang-2 byla prokázána u pevných nádorů i hematologických malignit (Imanishi, et al. 2011; Schulz, et al. 2011). Zvýšená koncentrace Ang-2 v plasmě byla potvrzena i u nemocných s CLL, kteří měli nemutovaný IGHV, vysokou expresi ZAP-70 či CD38 a u nemocných se středním či vysokým cytogenetickým rizikem a pokročilými stádii dle Bineta (Huttmann, et al. 2006; Maffei, et al. 2010b). Zdroj Ang-2 je však stále nedostatečně objasněný. Vysoká exprese Ang-2 maligními lymfocyty CLL byla potvrzena pouze v ojedinělých studiích u nemocných s nemutovaným IGHV a kratší dobou do progresu (Maffei, et al. 2007; Martinelli, et al. 2008), což jsme potvrdili i v naší pilotní studii ($n = 27$; $p = 0,010$), jejímž výsledkem byla i statisticky významná závislost mezi vysokou expresí mRNA pro Ang-2 a vysokou expresí CD38 ($n = 32$, $p = 0,011$) (Vrbacky, et al. 2010). Vyšší exprese mRNA Ang-2 u nemocných s nemutovaným IGHV byla potvrzena i v naší navazující hlavní studii analyzující expresi v separovaných CD19⁺ buňkách ($n = 80$, $p = 0,0023$). Rozdílná exprese u nemocných rozdělených podle exprese CD38 potvrzena nebyla ($n = 70$, $p = 0,6687$). Rozdíl mezi prognostickým významem koncentrace Ang-2 v plazmě nemocných a jeho expresí maligními lymfocyty je patrně způsoben expresí této molekuly jinými buňkami (např. endoteliálními) po autokrinní a parakrinní stimulaci jinými cytokiny, např. FGF-2 (Hegen et al. 2004). Nemocní s vysokou expresí Ang-2 analyzovaní v naší studii měli statisticky významně kratší dobu do progresu onemocnění. Tato analýza je však ovlivněna velkým zastoupením nemocných, kteří byli do studie přijati ve stádiu počínající progresu.

Endoglin, člen receptorového komplexu pro transformující růstový faktor beta, se účastní modulace signalizace prostřednictvím ligandu TGF- β , zejména buněčné proliferace a diferenciace (Barbara, et al. 1999; Cheifetz, et al. 1992). Hraje však důležitou roli

i v procesech vaskulárního remodelingu a angiogeneze. Zvýšená koncentrace solubilního endoglinu, odštěpené extracelulární domény endoglinu prostřednictvím metaloproteinázy MMP-14 (Takahashi, et al. 2001), byla zjištěna u řady pevných nádorů, ale i hematologických malignit (El-Gohary, et al. 2007; Gomez-Esquer, et al. 2004; Minhajat, et al. 2006; Nikiteas, et al. 2007; Takahashi, et al. 2001; Taskiran, et al. 2006). Důkazů o jeho působení u CLL je však velmi málo. Zvýšená exprese mRNA pro endoglin byla sice detekována v maligních lymfocytech CLL, tato analýza však byla provedena na velmi malém souboru nemocných a k jejím závěrům je třeba přistupovat velmi opatrně (Kay, et al. 2002). Zvýšená koncentrace endoglinu byla při porovnání se zdravými kontrolami potvrzena v plazmě nemocných s CLL. Tato koncentrace byla navíc vyšší u nemocných s progresivním onemocněním, pokročilým stádiem onemocnění a kratší dobou do zahájení léčby (Smolej, et al. 2008). Naše práce prokázala statisticky významně vyšší expresi endoglinu v maligních lymfocytech nemocných s nemutovaným IGHV ($n = 80$, $p < 0,0001$), vysokou expresí ZAP-70 ($n = 70$, $p = 0,0076$), nepříznivým karyotypem ($n = 97$, $p = 0,0223$), progresivním průběhem onemocnění ($n = 97$, $p = 0,0003$) a pokročilým stádiem dle Raie ($n = 97$, $p < 0,0001$) v době odběru. Nemocní s vysokou expresí endoglinu měli statisticky významně kratší dobu celkového přežití i dobu do progresu, což odpovídá předcházejícím výsledkům měřícím koncentraci této molekuly v plazmě. Analýza doby do progresu je však, stejně jako v případě Ang-2, ovlivněna velkým zastoupením nemocných, kteří byli do studie přijati ve stádiu počínající progresu onemocnění. Tito nemocní navíc měli statisticky významně vyšší expresi endoglinu a ta byla tudíž s vysokou pravděpodobností vyšší než medián. Výsledky naší studie není možné podrobněji diskutovat s literaturou, neboť srovnatelné výsledky se v současné literatuře nevyskytují a naše práce je v této oblasti první.

Fibroblastový růstový faktor 2 je angiogenní molekula zodpovědná za řadu procesů včetně buněčné proliferace, tvorby nových cév i růst nádorů (Bikfalvi and Han 1994). U nemocných s CLL byla ve srovnání se zdravými kontrolami prokázána zvýšená koncentrace FGF-2 v plazmě (Aguayo, et al. 2000). Tato koncentrace klesla po léčbě fludarabinem (Smolej, et al. 2007) či kladribinem (Gora-Tybor, et al. 2002). Zvýšená koncentrace FGF-2 v plazmě byla zjištěna u nemocných s pokročilým stádiem onemocnění a zvýšeným přežíváním maligních buněk (Aguayo, et al. 2000; Bairey, et al. 2001; Konig, et al. 1997; Romanov, et al. 2005). Dřívější studie provedená na našem pracovišti prokázala vztah mezi zvýšenou koncentrací FGF-2 v plazmě a nemutovaným IGHV (Smolej, et al. 2006). Vztah mezi prognózou CLL a expresí mRNA pro FGF-2 v maligních lymfocytech však stále nebyl objasněn. Výsledky naší práce ukazují vysokou variabilitu exprese FGF-2

mezi maligními lymfocyty jednotlivých nemocných s CLL. Variabilní exprese však nemá statisticky významný vztah se studovanými prognostickými znaky kromě klinického stádia dle Raie ($n = 97$, $p = 0,0432$). Doba do progresu onemocnění i doba celkového přežití se u nemocných s CLL rozdělených podle exprese FGF-2 statisticky významně nelišily. FGF-2 v plazmě nemocných CLL je tedy patrně produkován (stejně jako v případě Ang-2) i jinými buňkami, které přispívají ke zvýšené koncentraci cirkulujícího FGF-2 a mohou působit prostřednictvím parakrinní stimulace maligních lymfocytů (Krejci et al. 2003). Exprese FGF-2 je navíc post-transkripčně regulována prostřednictvím exprese anti-sense genu NUDT6 (MacFarlane and Murphy 2010). Naše studie jako první prokázala, že exprese NUDT6 v maligních lymfocytech je velmi stabilní a nemůže být tudíž zodpovědná za variabilní koncentraci FGF-2 v těchto buňkách.

V naší práci jsme prokázali statisticky významný vztah mezi vysokou expresí Ang-2 a zejména endoglinu a nepříznivými prognostickými ukazateli CLL. Ačkoli pro potvrzení našich výsledků u těchto molekul bude zapotřebí rozsáhlejší studie s větším počtem nemocných, delší dobou sledování a analýzou nemocných v časném stádiu CLL, stávající výsledky ukazují, že angiogeneze hraje významnou úlohu v biologii a klinickém průběhu tohoto onemocnění a angiogenní molekuly (obzvláště endoglin) jsou tak slibnými molekulárními prognostickými znaky.

7. Závěry

1. Expres Ang-2 v maligních lymfocytech nemocných s CLL je statisticky významně vyšší u nemocných s nemutovaným IGHV. Doba celkového přežití se u nemocných rozdělených do skupin podle exprese Ang-2 významně nelišila. Nemocní s vysokou expresí Ang-2 měli významně kratší dobu do léčby 1. linie. Získané výsledky rozšířily značně omezené poznatky, které jsou o této problematice v současné době k dispozici.
2. Gen pro endoglin byl statisticky významně více exprimován v maligních lymfocytech nemocných s CLL, kteří mají horší prognózu CLL určenou pomocí klasických (klinické stádium dle Raie a průběh onemocnění) i moderních prognostických ukazatelů (mutační stavu IGHV, exprese ZAP-70). U nemocných s vyšší expresí CD105 byla statisticky významně kratší doba celkového přežití i doby do progresu onemocnění. Práce zabývající se touto problematikou v takovémto rozsahu dosud zcela chyběla a výsledky naší studie ukazují, že exprese mRNA endoglinu v maligních lymfocytech CLL by mohla být v budoucnu používána jako laboratorně i finančně snadno dostupný prognostický ukazatel.
3. Kromě klinického stádia dle Raie se koncentrace transkriptu FGF-2 u nemocných rozdělených do skupin podle prognózy statisticky významně nelišila. Koncentrace FGF-2 neměla vliv ani na celkové přežití a čas do zahájení léčby 1. linie nemocných. Koncentrace proteinu FGF-2 v séru/plazmě nemocných je, jak ukázaly jiné práce, prognosticky významná. Podle výsledků této studie za to však není zodpovědná exprese FGF-2 samotnými maligními lymfocyty. Zároveň jsme jako první prokázali, že regulační transkript genu NUDT6 je v maligních lymfocytech CLL exprimován s velmi malou variabilitou a na vysoce variabilní koncentraci mRNA FGF-2 v těchto buňkách se tedy patrně nepodílí.

8. Seznam použité literatury (abecedně)

- ABRAMS, S. T., B. R. BROWN, M. ZUZEL AND J. R. SLUPSKY Vascular endothelial growth factor stimulates protein kinase C β II expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, Jun 3 2010, 115(22), 4447-4454.
- ACEBES-HUERTA, A., L. HUERGO-ZAPICO, A. P. GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. FERNANDEZ-GUIZAN, et al. Lenalidomide induces immunomodulation in chronic lymphocytic leukemia and enhances antitumor immune responses mediated by NK and CD4 T cells. *Biomed Res Int*, 2014, 2014, 265840.
- AGATHANGELIDIS, A., N. DARZENTAS, A. HADZIDIMITRIOU, X. BROCHET, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*, May 10 2012, 119(19), 4467-4475.
- AGUAYO, A., E. ESTEY, H. KANTARJIAN, T. MANSOURI, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, Dec 1 1999, 94(11), 3717-3721.
- AGUAYO, A., H. KANTARJIAN, T. MANSOURI, C. GIDEL, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, Sep 15 2000, 96(6), 2240-2245.
- AISENBERG, A. C. AND K. J. BLOCH Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. *N Engl J Med*, Aug 10 1972, 287(6), 272-276.
- ALLEN, C. D., T. OKADA, H. L. TANG AND J. G. CYSTER Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science*, Jan 26 2007, 315(5811), 528-531.
- ANAISSE, E. J., D. P. KONTOYIANNIS, S. O'BRIEN, H. KANTARJIAN, et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Annals of Internal Medicine*, Oct 1 1998, 129(7), 559-566.
- ANTIC, D., B. MIHALJEVIC, V. COKIC, M. D. FEKETE, et al. Patients with early stage chronic lymphocytic leukemia: new risk stratification based on molecular profiling. *Leukemia & lymphoma*, Jul 2011, 52(7), 1394-1397.
- BAER, C., R. CLAUS, L. P. FRENZEL, M. ZUCKNICK, et al. Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, Aug 1 2012, 72(15), 3775-3785.
- BAIREY, O., Y. ZIMRA, M. SHAKLAI AND E. RABIZADEH Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular

vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, May 2001, 113(2), 400-406.

BARBARA, N. P., J. L. WRANA AND M. LETARTE Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *The Journal of biological chemistry*, Jan 8 1999, 274(2), 584-594.

BAUM, C., O. KUSTIKOVA, U. MODLICH, Z. LI, et al. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Human Gene Therapy*, Mar 2006, 17(3), 253-263.

BAYLIN, S. B. AND J. G. HERMAN DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in genetics : TIG*, Apr 2000, 16(4), 168-174.

BELLOSILLO, B., N. VILLAMOR, D. COLOMER, G. PONS, et al. In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Oct 15 1999, 94(8), 2836-2843.

BENE, M. C. What is ZAP-70? *Cytometry B Clin Cytom*, Jul 15 2006, 70(4), 204-208.

BERGERS, G., R. BREKKEN, G. MCMAHON, T. H. VU, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*, Oct 2000, 2(10), 737-744.

BERGSTEN, E., M. UUTELA, X. LI, K. PIETRAS, et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nature cell biology*, May 2001, 3(5), 512-516.

BERLIN, C., R. F. BARGATZE, J. J. CAMPBELL, U. H. VON ANDRIAN, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, Feb 10 1995, 80(3), 413-422.

BERLIN, C., E. L. BERG, M. J. BRISKIN, D. P. ANDREW, et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, Jul 16 1993, 74(1), 185-195.

BERNABEU, C., B. A. CONLEY AND C. P. VARY Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *Journal of cellular biochemistry*, Dec 15 2007, 102(6), 1375-1388.

BERTILACCIO, M. T., C. SCIELZO, M. MUZIO AND F. CALIGARIS-CAPPIO An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best practice & research. Clinical haematology*, Mar 2010, 23(1), 21-32.

BERTOLINO, P., M. DECKERS, F. LEBRIN AND P. TEN DIJKE Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*, Dec 2005, 128(6 Suppl), 585S-590S.

BIKFALVI, A. AND Z. C. HAN Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia*, Mar 1994, 8(3), 523-529.

BINET, J. L., A. AUQUIER, G. DIGHIRO, C. CHASTANG, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, Jul 1 1981, 48(1), 198-206.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, Jan 1 2002, 16(1), 6-21.

BOBIK, A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Aug 2006, 26(8), 1712-1720.

BOELEN, J., J. PHILIPPE AND F. OFFNER B-CLL cells from lymph nodes express higher ZAP-70 levels than B-CLL cells from peripheral blood. *Leuk Res*, May 2007, 31(5), 719-720.

BOMBEN, R., M. DAL BO, D. CAPELLO, D. BENEDETTI, et al. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood*, Apr 1 2007, 109(7), 2989-2998.

BOMBEN, R., M. DAL BO, D. CAPELLO, F. FORCONI, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol*, Feb 2009, 144(4), 492-506.

BORCHERT, G. M., W. LANIER AND B. L. DAVIDSON RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, Dec 2006, 13(12), 1097-1101.

BRACHTL, G., K. SAHAKYAN, U. DENK, T. GIRBL, et al. Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One*, 2011, 6(8), e23758.

BRENTJENS, R., R. YEH, Y. BERNAL, I. RIVIERE, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther*, Apr 2010, 18(4), 666-668.

BRENTJENS, R. J., I. RIVIERE, J. H. PARK, M. L. DAVILA, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, Nov 3 2011, 118(18), 4817-4828.

BROWN, J. R., J. C. BYRD, S. E. COUTRE, D. M. BENSON, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, May 29 2014, 123(22), 3390-3397.

BUHL, A. M., D. F. JAMES, D. NEUBERG, S. JAIN, et al. Analysis of CLLU1 expression levels before and after therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, May 2011, 86(5), 405-411.

BUHL, A. M., J. JURLANDER, C. H. GEISLER, L. B. PEDERSEN, et al. CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, Jun 2006a, 76(6), 455-464.

BUHL, A. M., J. JURLANDER, F. S. JORGENSEN, A. M. OTTESEN, et al. Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 1 2006b, 107(7), 2904-2911.

BUCHNER, M., S. FUCHS, G. PRINZ, D. PFEIFER, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, Jul 1 2009, 69(13), 5424-5432.

BURGER, J. A. Angiopoietin-2 in CLL. *Blood*, Jul 2010, 116(4), 508-509.

BURGER, J. A., M. BURGER AND T. J. KIPPS Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, Dec 1 1999, 94(11), 3658-3667.

BURGER, J. A., N. TSUKADA, M. BURGER, N. J. ZVAIFLER, et al. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, Oct 15 2000, 96(8), 2655-2663.

BURGER, M., T. HARTMANN, M. KROME, J. RAWLUK, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, Sep 1 2005, 106(5), 1824-1830.

BURKLE, A., M. NIEDERMEIER, A. SCHMITT-GRAFF, W. G. WIERDA, et al. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Nov 1 2007, 110(9), 3316-3325.

BYRD, J. C., J. R. BROWN, S. O'BRIEN, J. C. BARRIENTOS, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, Jul 17 2014, 371(3), 213-223.

BYRD, J. C., R. R. FURMAN, S. E. COUTRE, I. W. FLINN, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, Jul 4 2013, 369(1), 32-42.

CAHILL, N., A. C. BERGH, M. KANDURI, H. GORANSSON-KULTIMA, et al. 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia*, Jan 2013, 27(1), 150-158.

CALIN, G. A., C. D. DUMITRU, M. SHIMIZU, R. BICHI, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic

leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Nov 26 2002, 99(24), 15524-15529.

CALIN, G. A., M. FERRACIN, A. CIMMINO, G. DI LEVA, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, Oct 27 2005, 353(17), 1793-1801.

CALPE, E., C. CODONY, M. J. BAPTISTA, P. ABRISQUETA, et al. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. Blood, Oct 20 2011, 118(16), 4401-4410.

CAO, Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. Science signaling, Feb 24 2009, 2(59), re1.

CATOVSKY, D., J. FOOKS AND S. RICHARDS Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. Br J Haematol, Jun 1989, 72(2), 141-149.

CATOVSKY, D., S. RICHARDS, E. MATUTES, D. OSCIER, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. Lancet, Jul 21 2007, 370(9583), 230-239.

CAVAZZINI, F., J. A. HERNANDEZ, A. GOZZETTI, A. RUSSO ROSSI, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. Br J Haematol, Aug 2008, 142(4), 529-537.

CEDAR, H. AND Y. BERGMAN Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nature reviews. Genetics, May 2009, 10(5), 295-304.

CIMMINO, A., G. A. CALIN, M. FABBRI, M. V. IORIO, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Sep 27 2005, 102(39), 13944-13949.

CONLEY, B. A., R. KOLEVA, J. D. SMITH, D. KACER, et al. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. The Journal of biological chemistry, Jun 25 2004, 279(26), 27440-27449.

CRESPO, M., F. BOSCH, N. VILLAMOR, B. BELLOSILLO, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, May 1 2003, 348(18), 1764-1775.

CROWTHER-SWANEPOEL, D., P. BRODERICK, M. C. DI BERNARDO, S. E. DOBBINS, et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nature genetics*, Feb 2010, 42(2), 132-136.

CUESTA-MATEOS, C., S. LOPEZ-GIRAL, M. ALFONSO-PEREZ, V. G. DE SORIA, et al. Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Hematology*, Sep 2010, 38(9), 756-764, 764 e751-754.

CUNI, S., P. PEREZ-ACIEGO, G. PEREZ-CHACON, J. A. VARGAS, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*, Aug 2004, 18(8), 1391-1400.

DAL BO, M., F. M. ROSSI, D. ROSSI, C. DEAMBROGI, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, Aug 2011, 50(8), 633-643.

DAMESHEK, W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*, Apr 1967, 29(4), Suppl:566-584.

DAMLE, R. N., T. WASIL, F. FAIS, F. GHIOTTO, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Sep 15 1999, 94(6), 1840-1847.

DE GORTER, D. J., E. A. BEULING, R. KERSSEBOOM, S. MIDDENDORP, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity*, Jan 2007, 26(1), 93-104.

DEAGLIO, S., M. MORRA, R. MALLONE, C. M. AUSIELLO, et al. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *Journal of immunology*, Jan 1 1998, 160(1), 395-402.

DEAGLIO, S., T. VAISITTI, L. BERGUI, L. BONELLO, et al. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood*, Apr 15 2005, 105(8), 3042-3050.

DEBIEN, E., E. HERVOUET, F. GAUTIER, P. JUIN, et al. ABT-737 and/or folate reverse the PDGF-induced alterations in the mitochondrial apoptotic pathway in low-grade glioma patients. *Clinical epigenetics*, Aug 2011, 2(2), 369-381.

DEL GIUDICE, I., D. ROSSI, S. CHIARETTI, M. MARINELLI, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*, Mar 2012, 97(3), 437-441.

DEWALD, G. W., S. R. BROCKMAN, S. F. PATERNOSTER, N. D. BONE, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, Apr 2003, 121(2), 287-295.

DI IASIO, M. G., A. NORCIO, E. MELLONI AND G. ZAULI SOCS1 is significantly up-regulated in Nutlin-3-treated p53 wild-type B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) samples and shows an inverse correlation with miR-155. *Investigational New Drugs*, Dec 2012, 30(6), 2403-2406.

DI LEVA, G., D. BRISKIN AND C. M. CROCE MicroRNA in cancer: new hopes for antineoplastic chemotherapy. *Upsala journal of medical sciences*, May 2012, 117(2), 202-216.

DI RAIMONDO, F., R. GIUSTOLISI, S. LERNER, E. CACCIOLA, et al. Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Ann Oncol*, May 2001, 12(5), 621-625.

DICKER, F., H. HERHOLZ, S. SCHNITTGER, A. NAKAO, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, Jan 2009, 23(1), 117-124.

DIGHIERO, G., K. MALOUM, B. DESABLENS, B. CAZIN, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, May 21 1998, 338(21), 1506-1514.

DING, W., T. R. KNOX, R. C. TSCHUMPER, W. WU, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood*, Oct 21 2010, 116(16), 2984-2993.

DOHNER, H., S. STILGENBAUER, A. BENNER, E. LEUPOLT, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, Dec 28 2000, 343(26), 1910-1916.

DOHNER, H., S. STILGENBAUER, M. R. JAMES, A. BENNER, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, Apr 1 1997, 89(7), 2516-2522.

DOUBEK, M., Y. BRYCHTOVA, A. PANOVSKA, L. SEBEJOVA, et al. Ofatumumab added to dexamethasone in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: Results from a phase II study. *American Journal of Hematology*, May 2015, 90(5), 417-421.

DUENSING, S. AND J. ATZPODIEN Increased intracellular and plasma levels of basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 1 1995, 85(7), 1978-1980.

DUHREN-VON MINDEN, M., R. UBELHART, D. SCHNEIDER, T. WOSSNING, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*, Sep 13 2012, 489(7415), 309-312.

DUNWELL, T. L., R. E. DICKINSON, T. STANKOVIC, A. DALLOL, et al. Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in chronic and acute lymphocytic leukemia. *Epigenetics*, May 16 2009, 4(4), 265-269.

DURIG, J., M. NASCHAR, U. SCHMUCKER, K. RENZING-KOHLER, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, Jan 2002, 16(1), 30-35.

EDELMANN, J., K. HOLZMANN, F. MILLER, D. WINKLER, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, Dec 6 2012, 120(24), 4783-4794.

EDELMANN, J., L. KLEIN-HITPASS, A. CARPINTEIRO, A. FUHRER, et al. Bone marrow fibroblasts induce expression of PI3K/NF-kappaB pathway genes and a pro-angiogenic phenotype in CLL cells. *Leukemia Research*, Oct 2008, 32(10), 1565-1572.

EICHHORST, B., A. M. FINK, R. BUSCH, G. KOVACS, et al. Frontline Chemoimmunotherapy with Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Shows Superior Efficacy in Comparison to Bendamustine (B) and Rituximab (BR) in Previously Untreated and Physically Fit Patients (pts) with Advanced Chronic *Blood*, 2014-12-06 00:00:00 2014, 124(21), 19-19.

EICHHORST, B. F., R. BUSCH, G. HOPFINGER, R. PASOLD, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Feb 1 2006, 107(3), 885-891.

EKSIOGLU-DEMIRALP, E., O. ALPDOGAN, M. AKTAN, T. FIRATLI, et al. Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia*, Aug 1996, 10(8), 1331-1339.

EL-GOHARY, Y. M., J. F. SILVERMAN, P. R. OLSON, Y. L. LIU, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*, Apr 2007, 127(4), 572-579.

ELICES, M. J., L. OSBORN, Y. TAKADA, C. CROUSE, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, Feb 23 1990, 60(4), 577-584.

ELTER, T., L. GERCHEVA-KYUCHUKOVA, H. PYLYLPENKO, T. ROBAK, et al. Fludarabine plus alemtuzumab versus fludarabine alone in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia: a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, Dec 2011, 12(13), 1204-1213.

FABBRI, G., S. RASI, D. ROSSI, V. TRIFONOV, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*, Jul 4 2011, 208(7), 1389-1401.

FABRIS, S., V. BOLLATI, L. AGNELLI, F. MORABITO, et al. Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*, Feb 2011, 6(2), 188-194.

FASOLA, G., R. FANIN, F. GHERLINZONI, P. GALIENI, et al. Serum LDH concentration in non-Hodgkin's lymphomas. Relationship to histologic type, tumor mass, and presentation features. *Acta Haematol*, 1984, 72(4), 231-238.

FERRAJOLI, A., B. N. LEE, E. J. SCHLETTE, S. M. O'BRIEN, et al. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jun 1 2008, 111(11), 5291-5297.

FERRARA, N., H. P. GERBER AND J. LECOUTER The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, Jun 2003, 9(6), 669-676.

FISCHER, K., P. CRAMER, R. BUSCH, S. BOTTCHE, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, Sep 10 2012, 30(26), 3209-3216.

FLUCKIGER, A. C., J. F. ROSSI, A. BUSSEL, P. BRYON, et al. Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood*, Dec 15 1992, 80(12), 3173-3181.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, Nov 18 1971, 285(21), 1182-1186.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology*, Dec 2002, 29(6 Suppl 16), 15-18.

FORSTER, R., A. C. DAVALOS-MISLITZ AND A. ROT CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews. Immunology*, May 2008, 8(5), 362-371.

FRIEDBERG, J. W., J. SHARMAN, J. SWEETENHAM, P. B. JOHNSTON, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 1 2010, 115(13), 2578-2585.

FRIESEL, R. E. AND T. MACIAG Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Jul 1995, 9(10), 919-925.

FULCI, V., S. CHIARETTI, M. GOLDONI, G. AZZALIN, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jun 1 2007, 109(11), 4944-4951.

FULOP, Z., B. CSERNUS, B. TIMAR, A. SZEPESI, et al. Microsatellite instability and hMLH1 promoter hypermethylation in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, Feb 2003, 17(2), 411-415.

FUNARO, A., M. MORRA, L. CALOSSO, M. G. ZINI, et al. Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens*, Jan 1997, 49(1), 7-15.

FURMAN, R. R., Z. ASGARY, J. O. MASCARENHAS, H. C. LIOU, et al. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of immunology*, Feb 15 2000, 164(4), 2200-2206.

FURMAN, R. R., J. P. SHARMAN, S. E. COUTRE, B. D. CHESON, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, Mar 13 2014, 370(11), 997-1007.

GALTON, D. A. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Canadian Medical Association Journal*, May 7 1966, 94(19), 1005-1010.

GANJU, R. K., S. A. BRUBAKER, R. D. CHERNOCK, S. AVRAHAM, et al. Beta-chemokine receptor CCR5 signals through SHP1, SHP2, and Syk. *The Journal of biological chemistry*, Jun 9 2000, 275(23), 17263-17268.

GATTEI, V., P. BULIAN, M. I. DEL PRINCIPE, A. ZUCCHETTO, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jan 15 2008, 111(2), 865-873.

GEHRKE, I., R. K. GANDHIRAJAN, S. J. POLL-WOLBECK, M. HALLEK, et al. Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Molecular medicine*, 2011, 17(7-8), 619-627.

GENEVIER, H. C., S. HINSHELWOOD, H. B. GASPAR, K. P. RIGLEY, et al. Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *European journal of immunology*, Dec 1994, 24(12), 3100-3105.

GENTILE, M., G. CUTRONA, A. NERI, S. MOLICA, et al. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*, Jun 2009, 94(6), 887-888.

GHIA, E. M., S. JAIN, G. F. WIDHOPF, 2ND, L. Z. RASSENTI, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood*, May 15 2008, 111(10), 5101-5108.

GHIA, P., K. STAMATOPOULOS, C. BELESSI, C. MORENO, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*, Feb 15 2005, 105(4), 1678-1685.

GHOSH, A. K., C. R. SECRETO, T. R. KNOX, W. DING, et al. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood*, Mar 4 2010, 115(9), 1755-1764.

GIORDANO ATTIANESE, G. M., V. MARIN, V. HOYOS, B. SAVOLDO, et al. In vitro and in vivo model of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor. *Blood*, May 5 2011, 117(18), 4736-4745.

GOEDE, V., K. FISCHER, R. BUSCH, A. ENGELKE, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*, Mar 20 2014, 370(12), 1101-1110.

GOEDE, V., K. FISCHER, R. BUSCH, U. JAEGER, et al. Chemoimmunotherapy with GA101 plus chlorambucil in patients with chronic lymphocytic leukemia and comorbidity: results of the CLL11 (BO21004) safety run-in. *Leukemia*, Apr 2013, 27(5), 1172-1174.

GOEDE, V., K. FISCHER, A. ENGELKE, R. SCHLAG, et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia*, Jul 2015, 29(7), 1602-1604.

GOMEZ-ESQUER, F., D. AGUDO, F. MARTINEZ-ARRIBAS, M. J. NUNEZ-VILLAR, et al. mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer. *Anticancer research*, May-Jun 2004, 24(3a), 1581-1585.

GONZALEZ, D., M. ELSE, D. WREN, M. USAI, et al. CLLU1 expression has prognostic value in chronic lymphocytic leukemia after first-line therapy in younger patients and in those with mutated IGHV genes. *Haematologica*, Feb 2013, 98(2), 274-278.

GONZALEZ, D., P. MARTINEZ, R. WADE, S. HOCKLEY, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*, Jun 1 2011, 29(16), 2223-2229.

GORA-TYBOR, J., J. Z. BLONSKI AND T. ROBAK Cladribine decreases the level of angiogenic factors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, 2002, 49(3), 145-148.

GORA-TYBOR, J., J. Z. BLONSKI AND T. ROBAK Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *European Cytokine Network*, Jan-Mar 2005, 16(1), 41-46.

GORGUN, G., T. A. HOLDERRIED, D. ZAHRIEH, D. NEUBERG, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *The Journal of clinical investigation*, Jul 2005, 115(7), 1797-1805.

GUAN, J. L. AND R. O. HYNES Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell*, Jan 12 1990, 60(1), 53-61.

HACEIN-BEY-ABINA, S., A. GARRIGUE, G. P. WANG, J. SOULIER, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation*, Sep 2008, 118(9), 3132-3142.

HALLEK, M., K. FISCHER, G. FINGERLE-ROWSON, A. M. FINK, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, Oct 2 2010, 376(9747), 1164-1174.

HALLEK, M., B. D. CHESON, D. CATOVSKY, F. CALIGARIS-CAPPIO, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, Jun 15 2008, 111(12), 5446-5456.

HAMBLIN, T. J., Z. DAVIS, A. GARDINER, D. G. OSCIER, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Sep 15 1999, 94(6), 1848-1854.

HAMBLIN, T. J., J. A. ORCHARD, R. E. IBBOTSON, Z. DAVIS, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, Feb 1 2002, 99(3), 1023-1029.

HANADA, M., D. DELIA, A. AIELLO, E. STADTMAUER, et al. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Sep 15 1993, 82(6), 1820-1828.

HANOUN, M., L. EISELE, M. SUZUKI, J. M. GREALLY, et al. Epigenetic silencing of the circadian clock gene CRY1 is associated with an indolent clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*, 2012, 7(3), e34347.

HARTMANN, T. N., V. GRABOVSKY, W. WANG, P. DESCH, et al. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res*, Apr 1 2009, 69(7), 3121-3130.

HEGEN, A., S. KOIDL, K. WEINDEL, D. MARME, et al. Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Oct 2004, 24(10), 1803-1809.

HELDIN, C. H. AND B. WESTERMARK Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*, Oct 1999, 79(4), 1283-1316.

HEMLER, M. E., M. J. ELICES, C. PARKER AND Y. TAKADA Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunological reviews*, Apr 1990, 114, 45-65.

HERMAN, S. E., A. L. GORDON, E. HERTLEIN, A. RAMANUNNI, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*, Jun 9 2011, 117(23), 6287-6296.

HERNANDEZ, J. A., K. J. LAND AND R. W. MCKENNA Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. *Cancer*, Jan 1 1995, 75(1 Suppl), 381-394.

HO, C. L., L. F. HSU, R. L. PHYLIKY AND C. Y. LI Autocrine expression of platelet-derived growth factor B in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematologica*, 2005, 114(3), 133-140.

HOELLENRIEGEL, J., S. A. MEADOWS, M. SIVINA, W. G. WIERDA, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Sep 29 2011, 118(13), 3603-3612.

HOLASH, J., P. C. MAISONPIERRE, D. COMPTON, P. BOLAND, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, Jun 18 1999, 284(5422), 1994-1998.

HOLMES, K., O. L. ROBERTS, A. M. THOMAS AND M. J. CROSS Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling*, Oct 2007, 19(10), 2003-2012.

HUDECEK, M., T. M. SCHMITT, S. BASKAR, M. T. LUPO-STANGHELLINI, et al. The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, Nov 25 2010, 116(22), 4532-4541.

HUSSONG, J. W., G. M. RODGERS AND P. J. SHAMI Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, Jan 1 2000, 95(1), 309-313.

HUTTMANN, A., L. KLEIN-HITPASS, J. THOMALE, R. DEENEN, et al. Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Leukemia*, Oct 2006, 20(10), 1774-1782.

HWANG, K. K., X. CHEN, D. M. KOZINK, M. GUSTILO, et al. Enhanced outgrowth of EBV-transformed chronic lymphocytic leukemia B cells mediated by coculture with macrophage feeder cells. *Blood*, Feb 16 2012, 119(7), e35-44.

CHAN, A. C., M. IWASHIMA, C. W. TURCK AND A. WEISS ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, Nov 13 1992, 71(4), 649-662.

CHEIFETZ, S., T. BELLON, C. CALES, S. VERA, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, Sep 25 1992, 267(27), 19027-19030.

CHEN, C. I., P. L. BERGSAGEL, H. PAUL, W. XU, et al. Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, Mar 20 2011, 29(9), 1175-1181.

CHEN, H., A. T. TREWEEKE, D. C. WEST, K. J. TILL, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, Nov 1 2000, 96(9), 3181-3187.

CHEN, L., J. APGAR, L. HUYNH, F. DICKER, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Mar 1 2005, 105(5), 2036-2041.

CHEN, L., G. WIDHOPF, L. HUYNH, L. RASSENTI, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Dec 15 2002, 100(13), 4609-4614.

CHESON, B. D., J. M. BENNETT, M. GREVER, N. KAY, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, Jun 15 1996, 87(12), 4990-4997.

CHIORAZZI, N. AND M. FERRARINI Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*, Feb 10 2011, 117(6), 1781-1791.

CHIORAZZI, N., K. R. RAI AND M. FERRARINI Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, Feb 24 2005, 352(8), 804-815.

IBRAHIM, S., M. KEATING, K. A. DO, S. O'BRIEN, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jul 1 2001, 98(1), 181-186.

IMANISHI, Y., B. HU, G. XIAO, X. YAO, et al. Angiopoietin-2, an angiogenic regulator, promotes initial growth and survival of breast cancer metastases to the lung through the integrin-linked kinase (ILK)-AKT-B cell lymphoma 2 (Bcl-2) pathway. *The Journal of biological chemistry*, Aug 19 2011, 286(33), 29249-29260.

JAIN, P. AND S. O'BRIEN Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park)*, Dec 2012, 26(12), 1146-1152.

JAMES, D. F., L. WERNER, J. R. BROWN, W. G. WIERDA, et al. Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter clinical-translational study from the chronic lymphocytic leukemia research consortium. *J Clin Oncol*, Jul 1 2014, 32(19), 2067-2073.

JOHNSON, J. D., E. L. FORD, E. BERNAL-MIZRACHI, K. L. KUSSER, et al. Suppressed insulin signaling and increased apoptosis in CD38-null islets. *Diabetes*, Oct 2006, 55(10), 2737-2746.

JOSEFSSON, P., C. H. GEISLER, H. LEFFERS, J. H. PETERSEN, et al. CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jun 1 2007, 109(11), 4973-4979.

JOU, S. T., N. CARPINO, Y. TAKAHASHI, R. PIEKORZ, et al. Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Molecular and cellular biology*, Dec 2002, 22(24), 8580-8591.

KADERI, M. A., M. KANDURI, A. M. BUHL, M. SEVOV, et al. LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, Aug 2011, 96(8), 1153-1160.

KALOS, M., B. L. LEVINE, D. L. PORTER, S. KATZ, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*, Aug 10 2011, 3(95), 95ra73.

KAMIGUTI, A. S., E. S. LEE, K. J. TILL, R. J. HARRIS, et al. The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, Apr 2004, 125(2), 128-140.

KANDURI, M., N. CAHILL, H. GORANSSON, C. ENSTROM, et al. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jan 14 2010, 115(2), 296-305.

KANTHARIDIS, P., A. EL-OSTA, M. DESILVA, D. M. WALL, et al. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin Cancer Res*, Nov 1997, 3(11), 2025-2032.

KATZ, F. E., R. MICHALEVICZ, G. LAM, A. V. HOFFBRAND, et al. Effect of platelet-derived growth factor on enriched populations of haemopoietic progenitors from patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia Research*, 1987, 11(4), 339-344.

KAY, N. E., N. D. BONE, R. C. TSCHUMPER, K. H. HOWELL, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*, May 2002, 16(5), 911-919.

KAY, N. E. AND J. M. ZARLING Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood*, Feb 1984, 63(2), 305-309.

KIENLE, D., A. BENNER, A. KROBER, D. WINKLER, et al. Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood*, Mar 1 2006, 107(5), 2090-2093.

KIKUSHIGE, Y., F. ISHIKAWA, T. MIYAMOTO, T. SHIMA, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*, Aug 16 2011, 20(2), 246-259.

KINI, A. R., N. E. KAY AND L. C. PETERSON Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, Aug 2000, 14(8), 1414-1418.

KLEIN, U., Y. TU, G. A. STOLOVITZKY, M. MATTIOLI, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, Dec 3 2001, 194(11), 1625-1638.

KNAUF, W. U., T. LISSICHKOV, A. ALDAOUD, A. LIBERATI, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, Sep 10 2009, 27(26), 4378-4384.

KOCHENDERFER, J. N., M. E. DUDLEY, S. A. FELDMAN, W. H. WILSON, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical

trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, Mar 22 2012, 119(12), 2709-2720.

KOCHENDERFER, J. N., W. H. WILSON, J. E. JANIK, M. E. DUDLEY, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, Nov 18 2010, 116(20), 4099-4102.

KONIG, A., T. MENZEL, S. LYNEN, L. WRAZEL, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia*, Feb 1997, 11(2), 258-265.

KREJCI, P., J. FAITOVA, H. LAURELL, A. HAMPL, et al. FGF-2 expression and its action in human leukemia and lymphoma cell lines. *Leukemia*, Apr 2003, 17(4), 818-820.

KREJSEK, J. AND O. KOPECKÝ. B lymfocyty a protilátková odpověď. In *Klinická imunologie*. Nucleus HK, 2004, p. 241-270.

KROBER, A., T. SEILER, A. BENNER, L. BULLINGER, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Aug 15 2002, 100(4), 1410-1416.

KULIS, M., S. HEATH, M. BIBIKOVA, A. C. QUEIROS, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*, Nov 2012, 44(11), 1236-1242.

KUMAGAI, M., E. COUSTAN-SMITH, D. J. MURRAY, O. SILVENNOINEN, et al. Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. *J Exp Med*, Mar 1 1995, 181(3), 1101-1110.

LAGNEAUX, L., A. DELFORGE, D. BRON, C. DE BRUYN, et al. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*, Apr 1 1998, 91(7), 2387-2396.

LAMERS, C. H., S. SLEIJFER, A. G. VULTO, W. H. KRUIT, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol*, May 1 2006, 24(13), e20-22.

LAMERS, C. H., R. WILLEMSSEN, P. VAN ELZAKKER, S. VAN STEENBERGEN-LANGEVELD, et al. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. *Blood*, Jan 6 2011, 117(1), 72-82.

LANDGREN, O., M. ALBITAR, W. MA, F. ABBASI, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, Feb 12 2009, 360(7), 659-667.

LAPALOMBELLA, R., L. ANDRITSOS, Q. LIU, S. E. MAY, et al. Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway. *Blood*, Apr 1 2010, 115(13), 2619-2629.

LAVIN, M. F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, Oct 2008, 9(10), 759-769.

LEBRIN, F., M. DECKERS, P. BERTOLINO AND P. TEN DIJKE TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovascular research*, Feb 15 2005, 65(3), 599-608.

LEE, J. S., D. O. DIXON, H. M. KANTARJIAN, M. J. KEATING, et al. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*, Mar 1987, 69(3), 929-936.

LEE, Y., K. JEON, J. T. LEE, S. KIM, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, Sep 2 2002, 21(17), 4663-4670.

LEE, Y., M. KIM, J. HAN, K. H. YEOM, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, Oct 13 2004a, 23(20), 4051-4060.

LEE, Y. K., N. D. BONE, A. K. STREGE, T. D. SHANAFELT, et al. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Aug 1 2004b, 104(3), 788-794.

LEE, Y. K., T. D. SHANAFELT, N. D. BONE, A. K. STREGE, et al. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia*, Apr 2005, 19(4), 513-523.

LEPRETRE, S., T. AURRAN, B. MAHE, B. CAZIN, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*, May 31 2012, 119(22), 5104-5110.

LI, C., R. ISSA, P. KUMAR, I. N. HAMPSON, et al. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *Journal of Cell Science*, Jul 1 2003, 116(Pt 13), 2677-2685.

LI, X., A. PONTEN, K. AASE, L. KARLSSON, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nature cell biology*, May 2000, 2(5), 302-309.

LIN, K., M. A. GLENN, R. J. HARRIS, A. D. DUCKWORTH, et al. c-Abl expression in chronic lymphocytic leukemia cells: clinical and therapeutic implications. *Cancer Res*, Aug 2006, 66(15), 7801-7809.

LIPSANEN, V., P. LEINONEN, L. ALHONEN AND J. JANNE Hypomethylation of ornithine decarboxylase gene and erb-A1 oncogene in human chronic lymphatic leukemia. *Blood*, Dec 1988, 72(6), 2042-2044.

LONGO, P. G., L. LAURENTI, S. GOBESSI, S. SICA, et al. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, Jan 15 2008, 111(2), 846-855.

LOPEZ-GIRAL, S., N. E. QUINTANA, M. CABRERIZO, M. ALFONSO-PEREZ, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *Journal of leukocyte biology*, Aug 2004, 76(2), 462-471.

LYKO, F., D. STACH, A. BRENNER, S. STILGENBAUER, et al. Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Electrophoresis*, Jun 2004, 25(10-11), 1530-1535.

MACFARLANE, L. A. AND P. R. MURPHY Regulation of FGF-2 by an endogenous antisense RNA: effects on cell adhesion and cell-cycle progression. *Molecular carcinogenesis*, Dec 2010, 49(12), 1031-1044.

MAFFEI, R., R. MARASCA, S. MARTINELLI, I. CASTELLI, et al. Angiopoietin-2 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical outcome and immunoglobulin heavy-chain mutational status. *Leukemia*, Jun 2007, 21(6), 1312-1315.

MAFFEI, R., S. MARTINELLI, I. CASTELLI, R. SANTACHIARA, et al. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res*, Mar 2010a, 34(3), 312-321.

MAFFEI, R., S. MARTINELLI, R. SANTACHIARA, D. ROSSI, et al. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jul 29 2010b, 116(4), 584-592.

MAGNAC, C., R. PORCHER, F. DAVI, J. NATAF, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia*, Jan 2003, 17(1), 133-137.

MAGNONE, M., I. BAUER, A. POGGI, E. MANNINO, et al. NAD⁺ levels control Ca²⁺ store replenishment and mitogen-induced increase of cytosolic Ca²⁺ by Cyclic ADP-ribose-dependent TRPM2 channel gating in human T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, Jun 15 2012, 287(25), 21067-21081.

MALAVASI, F., S. DEAGLIO, A. FUNARO, E. FERRERO, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiological reviews*, Jul 2008, 88(3), 841-886.

MARASCA, R., R. MAFFEI, S. MARTINELLI, S. FIORCARI, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol*, Jun 2013, 31(2), 88-95.

MARTINELLI, S., M. KANDURI, R. MAFFEI, S. FIORCARI, et al. ANGPT2 promoter methylation is strongly associated with gene expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*, Jul 2013, 8(7), 720-729.

MARTINELLI, S., R. MAFFEI, I. CASTELLI, R. SANTACHIARA, et al. Increased expression of angiopoietin-2 characterizes early B-cell chronic lymphocytic leukemia with poor prognosis. *Leukemia Research*, Apr 2008, 32(4), 593-597.

MATUTES, E., D. OSCIER, J. GARCIA-MARCO, J. ELLIS, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*, Feb 1996, 92(2), 382-388.

MAURO, F. R., G. BANDINI, G. BAROSI, A. BILLIO, et al. SIE, SIES, GITMO updated clinical recommendations for the management of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, Apr 2012, 36(4), 459-466.

MCALLISTER, K. A., K. M. GROGG, D. W. JOHNSON, C. J. GALLIONE, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature genetics*, Dec 1994, 8(4), 345-351.

MELKI, J. R., P. C. VINCENT, R. D. BROWN AND S. J. CLARK Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood*, May 15 2000, 95(10), 3208-3213.

MELO, J. V., J. WARDLE, M. CHETTY, J. ENGLAND, et al. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. III. Evaluation of cell size by morphology and volume measurements. *Br J Haematol*, Nov 1986, 64(3), 469-478.

MENZEL, T., Z. RAHMAN, E. CALLEJA, K. WHITE, et al. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood*, Feb 1 1996, 87(3), 1056-1063.

MERUP, M., G. JULIUSSON, X. WU, M. JANSSON, et al. Amplification of multiple regions of chromosome 12, including 12q13-15, in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol*, Mar 1997, 58(3), 174-180.

MESSMER, B. T., D. MESSMER, S. L. ALLEN, J. E. KOLITZ, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation*, Mar 2005, 115(3), 755-764.

MESSMER, D., J. F. FECTEAU, M. O'HAYRE, I. S. BHARATI, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells receive RAF-dependent survival signals in response to CXCL12 that are sensitive to inhibition by sorafenib. *Blood*, Jan 20 2011, 117(3), 882-889.

MICHALEVICZ, R., F. KATZ, P. STROOBANT, G. JANOSSY, et al. Platelet-derived growth factor stimulates growth of highly enriched multipotent haemopoietic progenitors. *British Journal of Haematology*, Jul 1986, 63(3), 591-598.

MICHALLET, M., P. DREGER, L. SUTTON, R. BRAND, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: results of European intergroup randomized trial comparing autografting versus observation. *Blood*, Feb 3 2011, 117(5), 1516-1521.

MINHAJAT, R., D. MORI, F. YAMASAKI, Y. SUGITA, et al. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathology International*, Dec 2006, 56(12), 717-723.

MINOT, G. B. AND R. ISAACS Lymphatic Leukemia; Age Incidence, Duration, and Benefit Derived from Irradiation. *The Boston Medical and Surgical Journal*, 1924, 191(1), 1-9.

MOHLE, R., C. FAILENSCHMID, F. BAUTZ AND L. KANZ Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*, Dec 1999, 13(12), 1954-1959.

MOLICA, S., G. CUTRONA, G. VITELLI, R. MIRABELLI, et al. Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high-risk patients in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, Nov 2007, 31(11), 1575-1578.

MOLICA, S., A. VACCA, D. RIBATTI, A. CUNEO, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Nov 1 2002, 100(9), 3344-3351.

MOREAU, E. J., E. MATUTES, R. P. A'HERN, A. M. MORILLA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*, Oct 1997, 108(4), 378-382.

MORENO, P., C. ABREU, M. BORGE, F. PALACIOS, et al. Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia*, Mar 2013, 27(3), 721-725.

MORGAN, R. A., M. E. DUDLEY, J. R. WUNDERLICH, M. S. HUGHES, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, Oct 6 2006, 314(5796), 126-129.

MORGAN, R. A., J. C. YANG, M. KITANO, M. E. DUDLEY, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, Apr 2010, 18(4), 843-851.

MOSCA, L., S. FABRIS, M. LIONETTI, K. TODOERTI, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res*, Dec 1 2010, 16(23), 5641-5653.

MOSKALEV, E. A., K. LUCKERT, I. A. VOROBJEV, S. E. MASTITSKY, et al. Concurrent epigenetic silencing of wnt/beta-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer*, 2012, 12, 213.

MUELLER, S. N. AND R. N. GERMAIN Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, Sep 2009, 9(9), 618-629.

MULLER, G., U. E. HOPKEN AND M. LIPP The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunological reviews*, Oct 2003, 195, 117-135.

NARA, N., S. TOHDA, K. NAGATA, T. SUZUKI, et al. Effect of platelet-derived growth factor on the proliferation of blast progenitors from acute myeloblastic leukemia patients. *Acta Haematologica*, 1990, 83(4), 187-192.

NIEDERMEIER, M., B. T. HENNESSY, Z. A. KNIGHT, M. HENNEBERG, et al. Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood*, May 28 2009, 113(22), 5549-5557.

NIKITEAS, N. I., N. TZANAKIS, G. THEODOROPOULOS, V. ATSAVES, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2007, 10(1), 12-17.

NISHIO, M., T. ENDO, N. TSUKADA, J. OHATA, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*, Aug 1 2005, 106(3), 1012-1020.

OKKENHAUG, K. AND B. VANHAESEBROECK PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature reviews. Immunology*, Apr 2003, 3(4), 317-330.

ORTOLANO, S., I. Y. HWANG, S. B. HAN AND J. H. KEHRL Roles for phosphoinositide 3-kinases, Bruton's tyrosine kinase, and Jun kinases in B lymphocyte chemotaxis and homing. *European journal of immunology*, May 2006, 36(5), 1285-1295.

OSCIER, D. G., A. THOMPSETT, D. ZHU AND F. K. STEVENSON Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood*, Jun 1 1997, 89(11), 4153-4160.

OTROCK, Z. K., J. A. MAKAREM AND A. I. SHAMSEDDINE Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood cells, molecules & diseases*, May-Jun 2007, 38(3), 258-268.

OUILLETTE, P., H. ERBA, L. KUJAWSKI, M. KAMINSKI, et al. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*, Feb 15 2008a, 68(4), 1012-1021.

OUILLETTE, P., H. ERBA, L. KUJAWSKI, M. KAMINSKI, et al. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Research*, Feb 15 2008b, 68(4), 1012-1021.

PANAYIOTIDIS, P., D. JONES, K. GANESHAGURU, L. FORONI, et al. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*, Jan 1996, 92(1), 97-103.

PARTIDA-SANCHEZ, S., D. A. COCKAYNE, S. MONARD, E. L. JACOBSON, et al. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med*, Nov 2001, 7(11), 1209-1216.

PATZ, M., P. ISAEVA, N. FORCOB, B. MULLER, et al. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*, Feb 2011, 152(3), 295-306.

PAULSEN, R. D., D. V. SONI, R. WOLLMAN, A. T. HAHN, et al. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Molecular cell*, Jul 31 2009, 35(2), 228-239.

PEKARSKY, Y., U. SANTANAM, A. CIMMINO, A. PALAMARCHUK, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*, Dec 15 2006, 66(24), 11590-11593.

PEKOVA, S., J. MARKOVA, P. PAJER, M. DVORAK, et al. Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia.

Molecular diagnosis : a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology, 2005, 9(1), 23-34.

PELED, A., O. KOLLET, T. PONOMARYOV, I. PETIT, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, Jun 1 2000, 95(11), 3289-3296.

PEPPER, C., R. WARD, T. T. LIN, P. BRENNAN, et al. Highly purified CD38+ and CD38-sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia*, Apr 2007, 21(4), 687-696.

PEREZ-ATAYDE, A. R., S. E. SALLAN, U. TEDROW, S. CONNORS, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *The American journal of pathology*, Mar 1997, 150(3), 815-821.

PETERSON, L. AND A. R. KINI Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 15 2001, 97(8), 2529.

PFEIFER, D., M. PANTIC, I. SKATULLA, J. RAWLUK, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood*, Feb 1 2007, 109(3), 1202-1210.

PIZZOLO, G., M. CHILOSI, A. AMBROSETTI, G. SEMENZATO, et al. Immunohistologic study of bone marrow involvement in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Dec 1983, 62(6), 1289-1296.

PLUNKETT, W., V. GANDHI, P. HUANG, L. E. ROBERTSON, et al. Fludarabine: pharmacokinetics, mechanisms of action, and rationales for combination therapies. *Seminars in oncology*, Oct 1993, 20(5 Suppl 7), 2-12.

PODAR, K., Y. T. TAI, F. E. DAVIES, S. LENTZSCH, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*, Jul 15 2001, 98(2), 428-435.

PONADER, S., S. S. CHEN, J. J. BUGGY, K. BALAKRISHNAN, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*, Feb 2 2012, 119(5), 1182-1189.

PRATT, A. J. AND I. J. MACRAE The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of biological chemistry*, Jul 3 2009, 284(27), 17897-17901.

PUENTE, X. S., M. PINYOL, V. QUESADA, L. CONDE, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, Jul 7 2011, 475(7354), 101-105.

QUIROGA, M. P., K. BALAKRISHNAN, A. V. KURTOVA, M. SIVINA, et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood*, Jul 30 2009, 114(5), 1029-1037.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Staženo z: <http://www.R-project.org/>.

RAI, K. R., B. L. PETERSON, F. R. APPELBAUM, J. KOLITZ, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, Dec 14 2000, 343(24), 1750-1757.

RAI, K. R., A. SAWITSKY, E. P. CRONKITE, A. D. CHANANA, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Aug 1975, 46(2), 219-234.

RAMSAY, A. G. AND J. G. GRIBBEN The 3 Rs in CLL immune dysfunction. *Blood*, Apr 1 2010, 115(13), 2563-2564.

RASSENTI, L. Z., L. HUYNH, T. L. TOY, L. CHEN, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, Aug 26 2004, 351(9), 893-901.

RAVAL, A., D. M. LUCAS, J. J. MATKOVIC, K. L. BENNETT, et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, Jun 10 2005, 23(17), 3877-3885.

RAVAL, A., S. M. TANNER, J. C. BYRD, E. B. ANGERMAN, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, Jun 1 2007, 129(5), 879-890.

RAWSTRON, A. C., M. J. GREEN, A. KUZMICKI, B. KENNEDY, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*, Jul 15 2002, 100(2), 635-639.

REDONDO-MUNOZ, J., M. JOSE TEROL, J. A. GARCIA-MARCO AND A. GARCIA-PARDO Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. *Blood*, Jan 1 2008, 111(1), 383-386.

REDONDO-MUNOZ, J., E. UGARTE-BERZAL, M. J. TEROL, P. E. VAN DEN STEEN, et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer cell*, Feb 17 2010, 17(2), 160-172.

RESTIFO, N. P., M. E. DUDLEY AND S. A. ROSENBERG Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature reviews. Immunology*, Apr 2012, 12(4), 269-281.

RETTIG, M. P., G. ANSTAS AND J. F. DIPERSIO Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. *Leukemia*, Jan 2012, 26(1), 34-53.

RICHARDSON, S. J., C. MATTHEWS, M. A. CATHERWOOD, H. D. ALEXANDER, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, May 1 2006, 107(9), 3584-3592.

ROBAK, T., A. DMOSZYNSKA, P. SOLAL-CELIGNY, K. WARZOGA, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, Apr 1 2010, 28(10), 1756-1765.

ROBERTS, A. W., S. MA, D. M. BRANDER, T. J. KIPPS, et al. Determination of Recommended Phase 2 Dose of ABT-199 (GDC-0199) Combined with Rituximab (R) in Patients with Relapsed / Refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*, 2014-12-06 00:00:00 2014, 124(21), 325-325.

ROCHE LIFE SCIENCE. Universal ProbeLibrary Assay Design Center [online]. 2008. [citováno dne Sep 20 2008]. Dostupné z: <http://www.universalprobelibrary.com>.

ROMANO, M. F., A. LAMBERTI, P. TASSONE, F. ALFINITO, et al. Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, Aug 1 1998, 92(3), 990-995.

ROMANOV, V. V., C. H. JAMES, P. D. SHERRINGTON AND A. R. PETTITT Basic fibroblast growth factor suppresses p53 activation in the neoplastic cells of a proportion of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene*, Oct 13 2005, 24(45), 6855-6860.

ROSATI, E., R. SABATINI, G. RAMPINO, A. TABILIO, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*, Jan 22 2009, 113(4), 856-865.

ROSE, D. M., J. HAN AND M. H. GINSBERG Alpha4 integrins and the immune response. *Immunological reviews*, Aug 2002, 186, 118-124.

ROSEN, A., F. MURRAY, C. EVALDSSON AND R. ROSENQUIST Antigens in chronic lymphocytic leukemia--implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*, Dec 2010, 20(6), 400-409.

ROSENWALD, A., A. A. ALIZADEH, G. WIDHOPF, R. SIMON, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, Dec 3 2001, 194(11), 1639-1647.

ROSSI, D., C. L. BODONI, A. ZUCCHETTO, S. RASI, et al. Low CD49d expression and long telomere identify a chronic lymphocytic leukemia subset with highly favourable outcome. *American Journal of Hematology*, Aug 2010a, 85(8), 619-622.

ROSSI, D., M. CERRI, C. DEAMBROGI, E. SOZZI, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*, Feb 1 2009, 15(3), 995-1004.

ROSSI, D., M. FANGAZIO, S. RASI, T. VAISITTI, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Mar 22 2012a, 119(12), 2854-2862.

ROSSI, D., H. KHIABANIAN, V. SPINA, C. CIARDULLO, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 3 2014, 123(14), 2139-2147.

ROSSI, D., S. RASI, V. SPINA, A. BRUSCAGGIN, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Feb 21 2013, 121(8), 1403-1412.

ROSSI, D., S. RASI, V. SPINA, M. FANGAZIO, et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *British Journal of Haematology*, Aug 2012b, 158(3), 426-429.

ROSSI, D., A. ZUCCHETTO, F. M. ROSSI, D. CAPELLO, et al. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, Oct 2008, 93(10), 1575-1579.

ROSSI, S., M. SHIMIZU, E. BARBAROTTO, M. S. NICOLOSO, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*, Aug 12 2010b, 116(6), 945-952.

SADELAIN, M., R. BRENTJENS AND I. RIVIERE The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Current opinion in immunology*, Apr 2009, 21(2), 215-223.

SANO, Y., K. INAMURA, A. MIYAKE, S. MOCHIZUKI, et al. Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science*, Aug 17 2001, 293(5533), 1327-1330.

SANT, M., C. ALLEMANI, C. TEREANU, R. DE ANGELIS, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, Nov 11 2010, 116(19), 3724-3734.

SANTIBANEZ, J. F., A. LETAMENDIA, F. PEREZ-BARRIOCANAL, C. SILVESTRI, et al. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *Journal of Cellular Physiology*, Feb 2007, 210(2), 456-468.

SARFATI, M., S. CHEVRET, C. CHASTANG, G. BIRON, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Dec 1 1996, 88(11), 4259-4264.

SCIELZO, C., A. CAMPOREALE, M. GEUNA, M. ALESSIO, et al. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia*, Apr 2006, 20(4), 689-695.

SEIFERT, M., L. SELLMANN, J. BLOEHDORN, F. WEIN, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, Nov 19 2012, 209(12), 2183-2198.

SHAFFER, A. L., 3RD, R. M. YOUNG AND L. M. STAUDT Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annual review of immunology*, 2012, 30, 565-610.

SHANAFELT, T. D., J. C. BYRD, P. B. LA, C. S. ZENT, et al. Pretreatment angiogenic cytokines predict response to chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, Sep 2009, 146(6), 660-664.

SHANAFELT, T. D., S. M. GEYER, N. D. BONE, R. C. TSCHUMPER, et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol*, Mar 2008, 140(5), 537-546.

SHANKEY, T. V., M. FORMAN, P. SCIBELLI, J. COBB, et al. An optimized whole blood method for flow cytometric measurement of ZAP-70 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, Jul 15 2006, 70(4), 259-269.

SHERIDAN, R., T. MOUNAJJED, D. E. EHRMANN, P. E. HURTUBISE, et al. Comparison of bone marrow and peripheral blood ZAP-70 status examined by flow cytometric immunophenotyping in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, Jul 15 2006, 70(4), 320-321.

SCHROEDER, H. W., JR. AND G. DIGHIERO The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunology Today*, Jun 1994, 15(6), 288-294.

SCHULZ, P., C. FISCHER, K. M. DETJEN, S. RIEKE, et al. Angiopoietin-2 drives lymphatic metastasis of pancreatic cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Oct 2011, 25(10), 3325-3335.

SCHWAENEN, C., M. NESSLING, S. WESSENDORF, T. SALVI, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jan 27 2004, 101(4), 1039-1044.

SIEGEL, R., J. MA, Z. ZOU AND A. JEMAL. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Jan-Feb 2014, 64(1), 9-29.

SLAGER, S. L., L. R. GOLDIN, S. S. STROM, M. C. LANASA, et al. Genetic susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, Apr 2010, 19(4), 1098-1102.

SMOLEJ, L. Therapy of elderly/comorbid patients with chronic lymphocytic leukemia. *Current pharmaceutical design*, 2012, 18(23), 3399-3405.

SMOLEJ, L., C. ANDRYS, D. BELADA, M. HRUDKOVA, et al. Plazmaticke koncentrace solubilniho endoglinu maji prognosticky vyznam u nemocnych s chronickou lymfocytarni leukemií [Plasma levels of soluble endoglin have prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia]. *Transfuzie Hematol. dnes*, 2008, 14(1), 24-27.

SMOLEJ, L., C. ANDRYS, J. KREJSEK, D. Z. BELADA, et al. Bazicky fibroblastovy rustovy faktor (bFGF) a cevni endotelovy rustovy faktor (VEGF) jsou zvyšeny v plazme periferni krve nemocnych s chronickou lymfocytarni leukemií a klesaji po intenzivni lece obsahujici fludarabin [Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are elevated in peripheral blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and decrease after intensive fludarabine-based treatment]. *Vnitřní lékařství*, Nov 2007, 53(11), 1171-1176.

SMOLEJ, L., C. ANDRYS, S. PEKOVA, J. SCHWARZ, et al. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, Oct 2006, 91(10), 1432-1433.

SMOLEJ, L., M. DOUBEK, A. PANOVSKA, M. SIMKOVIC, et al. Rituximab in combination with high-dose dexamethasone for the treatment of relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, Oct 2012, 36(10), 1278-1282.

SOUERS, A. J., J. D. LEVERSON, E. R. BOGHAERT, S. L. ACKLER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, Feb 2013, 19(2), 202-208.

SPAARGAREN, M., E. A. BEULING, M. L. RURUP, H. P. MEIJER, et al. The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *J Exp Med*, Nov 17 2003, 198(10), 1539-1550.

SPORTOLETTI, P., S. BALDONI, L. CAVALLI, B. DEL PAPA, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *British Journal of Haematology*, Nov 2010, 151(4), 404-406.

STAMATOPOULOS, B., N. MEULEMAN, B. HAIBE-KAINS, P. SAUSSOY, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*, May 21 2009, 113(21), 5237-5245.

STAMATOPOULOS, K., C. BELESSI, C. MORENO, M. BOUDJOGRAH, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*, Jan 1 2007, 109(1), 259-270.

STEPHENS, P. J., C. D. GREENMAN, B. FU, F. YANG, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, Jan 7 2011, 144(1), 27-40.

STEURER, M., G. PALL, S. RICHARDS, G. SCHWARZER, et al. Purine antagonists for chronic lymphocytic leukaemia. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, (3), CD004270.

STEVENSON, F. K., S. KRYSOV, A. J. DAVIES, A. J. STEELE, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Oct 20 2011, 118(16), 4313-4320.

STILGENBAUER, S., P. LICHTER AND H. DOHNER Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Reviews in clinical and experimental hematology*, Mar 2000, 4(1), 48-72.

STRATHDEE, G., T. L. HOLYOAKE, A. SIM, A. PARKER, et al. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*, Sep 1 2007, 13(17), 5048-5055.

SUN, L., J. IQBAL, S. DOLGILEVICH, T. YUEN, et al. Disordered osteoclast formation and function in a CD38 (ADP-ribosyl cyclase)-deficient mouse establishes an essential role for CD38 in bone resorption. *FASEB J*, Mar 2003, 17(3), 369-375.

TAKAHASHI, N., R. KAWANISHI-TABATA, A. HABA, M. TABATA, et al. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res*, Mar 2001, 7(3), 524-532.

TAM, C. S., S. O'BRIEN, W. WIERDA, H. KANTARJIAN, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Aug 15 2008, 112(4), 975-980.

TAM, C. S., T. D. SHANAFELT, W. G. WIERDA, L. V. ABRUZZO, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*, Jul 30 2009, 114(5), 957-964.

TASKIRAN, C., O. ERDEM, A. ONAN, O. ARISOY, et al. The prognostic value of endoglin (CD105) expression in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, Sep-Oct 2006, 16(5), 1789-1793.

TEELING, J. L., W. J. MACKUS, L. J. WIEGMAN, J. H. VAN DEN BRAKEL, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *Journal of immunology*, Jul 1 2006, 177(1), 362-371.

THORNTON, P. D., C. FERNANDEZ, G. M. GIUSTOLISI, R. MORILLA, et al. CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J*, 2004, 5(2), 145-151.

THORSELIUS, M., A. KROBER, F. MURRAY, U. THUNBERG, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*, Apr 1 2006, 107(7), 2889-2894.

TILL, B. G., M. C. JENSEN, J. WANG, X. QIAN, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, Apr 26 2012, 119(17), 3940-3950.

TILL, K. J., D. G. SPILLER, R. J. HARRIS, H. CHEN, et al. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood*, Jun 15 2005, 105(12), 4813-4819.

TOBIN, G., U. THUNBERG, A. JOHNSON, I. ERIKSSON, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*, Jun 15 2003, 101(12), 4952-4957.

TOBIN, G., U. THUNBERG, A. JOHNSON, I. THORN, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Mar 15 2002, 99(6), 2262-2264.

TOBIN, G., U. THUNBERG, K. KARLSSON, F. MURRAY, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Nov 1 2004, 104(9), 2879-2885.

UGARTE-BERZAL, E., J. REDONDO-MUNOZ, P. EROLES, M. H. DEL CERRO, et al. VEGF/VEGFR2 interaction down-regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood*, Jan 28 2010, 115(4), 846-849.

VAGO, L., S. K. PERNA, M. ZANUSSI, B. MAZZI, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, Jul 30 2009, 361(5), 478-488.

VAISITTI, T., S. AYDIN, D. ROSSI, F. COTTINO, et al. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, May 2010, 24(5), 958-969.

VAN BOCKSTAELE, F., B. VERHASSELT AND J. PHILIPPE Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Reviews*, Jan 2009, 23(1), 25-47.

VAN DYKE, D. L., T. D. SHANAFELT, T. G. CALL, C. S. ZENT, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, Feb 2010, 148(4), 544-550.

VERA, J., B. SAVOLDO, S. VIGOUROUX, E. BIAGI, et al. T lymphocytes redirected against the kappa light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood*, Dec 1 2006, 108(12), 3890-3897.

VRBACKY, F., L. SMOLEJ, V. VROBLOVA, S. PEKOVA, et al. Angiopoietin-2 mRNA expression is increased in chronic lymphocytic leukemia patients with poor prognostic features. *Hematology*, Aug 2010, 15(4), 210-214.

WANG, J., M. JENSEN, Y. LIN, X. SUI, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Human Gene Therapy*, Aug 2007, 18(8), 712-725.

WANG, L., M. S. LAWRENCE, Y. WAN, P. STOJANOV, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, Dec 29 2011, 365(26), 2497-2506.

WENG, A. P., A. A. FERRANDO, W. LEE, J. P. T. MORRIS, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, Oct 8 2004, 306(5694), 269-271.

WORTIS, H. H., M. TEUTSCH, M. HIGER, J. ZHENG, et al. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Apr 11 1995, 92(8), 3348-3352.

WOYACH, J. A., A. J. JOHNSON AND J. C. BYRD The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, Aug 9 2012, 120(6), 1175-1184.

YAMAMOTO, S., S. SHIMIZU, S. KIYONAKA, N. TAKAHASHI, et al. TRPM2-mediated Ca²⁺influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*, Jul 2008, 14(7), 738-747.

YU, M. K., H. BERGONIA, A. SZABO AND J. D. PHILLIPS Progressive disease in chronic lymphocytic leukemia is correlated with the DNA methylation index. *Leuk Res*, Jun 2007, 31(6), 773-777.

YUILLE, M. R., A. CONDIE, E. M. STONE, J. WILSHER, et al. TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes, Chromosomes and Cancer*, Apr 2001, 30(4), 336-341.

YVON, E., M. DEL VECCHIO, B. SAVOLDO, V. HOYOS, et al. Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clin Cancer Res*, Sep 15 2009, 15(18), 5852-5860.

ZABLOTSKA, L. B., D. BAZYKA, J. H. LUBIN, N. GUDZENKO, et al. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among chornobyl cleanup workers. *Environmental health perspectives*, Jan 2013, 121(1), 59-65.

ZARBOCK, A., C. A. LOWELL AND K. LEY Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity*, Jun 2007, 26(6), 773-783.

ZENG, Y., R. YI AND B. R. CULLEN Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*, Jan 12 2005, 24(1), 138-148.

ZENZ, T., A. KROBER, K. SCHERER, S. HABE, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, Oct 15 2008, 112(8), 3322-3329.

ZENZ, T., J. MOHR, E. ELDERING, A. P. KATER, et al. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 16 2009, 113(16), 3801-3808.

ZENZ, T., D. VOLLMER, M. TRBUSEK, J. SMARDOVA, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, Dec 2010, 24(12), 2072-2079.

ZHAO, Y., Q. J. WANG, S. YANG, J. N. KOCHENDERFER, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *Journal of immunology*, Nov 1 2009, 183(9), 5563-5574.

ZHU, D. X., W. ZHU, C. FANG, L. FAN, et al. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*, Jul 2012, 33(7), 1294-1301.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, Apr 2005, 5(4), 263-274.

ZUCCHETTO, A., R. BOMBEN, M. DAL BO, P. BULIAN, et al. CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia*, Mar 2006a, 20(3), 523-525; author reply 528-529.

ZUCCHETTO, A., R. BOMBEN, M. DAL BO, P. SONEGO, et al. A scoring system based on the expression of six surface molecules allows the identification of three prognostic risk groups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol*, May 2006b, 207(2), 354-363.

ZUPO, S., E. RUGARI, M. DONO, G. TABORELLI, et al. CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells. *European journal of immunology*, May 1994, 24(5), 1218-1222.